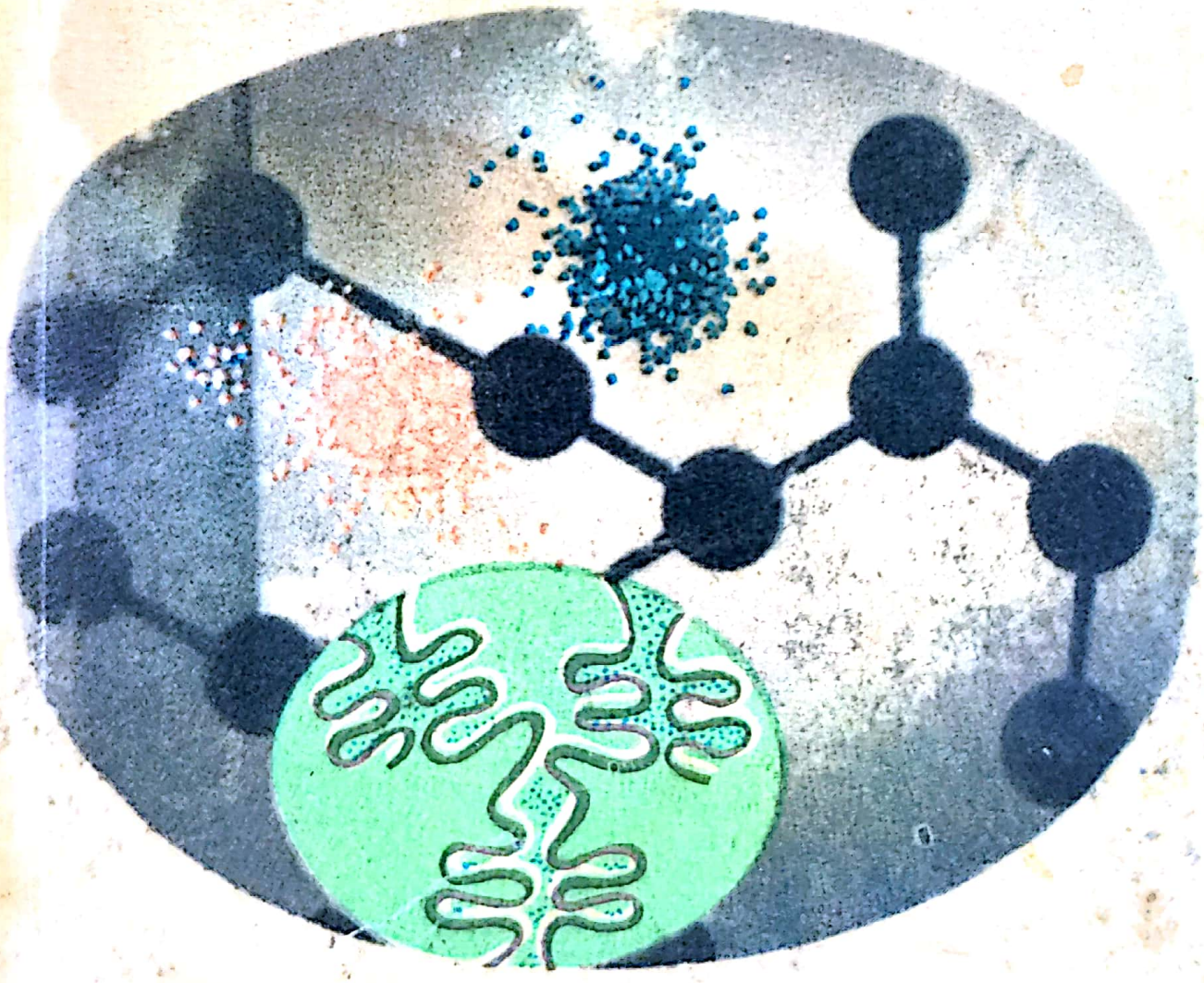
orizonturi

25

V. Gheţie

anticorpii în acțiune



Scanned with OKEN Scanner

V. Gheţie

Anticorpii în acţiune

Bucureşti, 1971

Scanned with OKEN Scanner

1

În care se pune o întrebare și se răspunde printr-un scurt istoric al descoperirii și cunoașterii anticorpilor

Descoperirea anticorpilor a încheiat un drum anevoios bătut „per pedes apostolorum" de acei bărbați luminați care și-au frământat mințile să răspundă la întrebarea, veche de cînd lumea: de ce oamenii care fac o anumită boală (variolă, pojar) nu o mai repetă în tot restul vieții lor?

Pasteur și Mecinikov

Primul care a încercat să dea un răspuns a fost Pasteur, prin 1880. El a ajuns la acest moment culminant printr-o suită de strălucite experiențe care au pornit de la o ... neglijență. O cultură de bacili care provocau holera găinilor, uitată cîteva săptămîni pe o masă de laborator,

Scanned with OKEN Scanner

s-a dovedit incapabilă de a produce boala mortală la găini. Injectînd apoi aceste găini cu o cultură proaspătă, ea nu mai era în stare să le producă nici un rău, deși omora pe capete găinile care nu fuseseră injectate în prealabil cu cultura veche. Această experiență verifica pe animale, în condițiile laboratorului, observația empirică potrivit căreia indivizii devin rezistenți pentru toată viața în urma contractării unei boli. Mai mult, experiența pasteuriană descrisă mai sus a demonstrat că starea de rezistență apare în urma contactului cu agentul patogen chiar dacă acesta nu declanșează simptomele caracteristice bolii, așa cum s-a întîmplat cu cultura de bacili holerici îmblînziți prin învechire. Acest ultim fapt a fost decisiv pentru ca Pasteur și toată armata de cercetători care l-a urmat să poată obține animale apte să supraviețuiască bolii și astfel să poată deveni obiect de cercetare.

Această „incapacitate" binecuvîntată a animalelor și a oamenilor de a repeta boala s-a numit *imunitate dobîndită*. Este poate cazul să spunem că termenul de *imunitate* desemnează însușirea organismului de a nu se îmbolnăvi atunci cînd intră în contact cu un agent patogen. Această lipsă de receptivitate poate fi înnăscută, fiind caracteristică unei specii animale date. Astfel, animalele, cu excepția maimuței, nu se îmbolnăvesc de poliomielită, iar omul nu se îmbolnăvește de anumite boli ale animalelor. În acest caz este vorba de o *imunitate naturală*. Așa cum o arată și cuvîntul, *imunitatea dobîndită* este lipsa de receptivitate pe care un organism o cîștigă în cursul vieții sale individuale, fie în urma

Scanned with OKEN Scanner

faptului că el face boala, fie că primește un tratament care „mimează" boala, așa cum s-a făcut cu găinile cărora li s-a inoculat cultura de bacili cu virulență atenuată. Acest tratament care constă în administrarea bacteriilor, virusurilor și produselor derivate, cu scopul de a realiza o imunitate viitoare față de boală, a fost numit de Pasteur vaccinare și este în prezent atît de notoriu încît nu necesită nici un comentariu.

Consecințele practice ale acestei descoperiri au fost atît de covîrșitoare încît nici chiar un Pasteur nu s-a putut ridica peste ele. De aceea, el a încercat mai mult să le aplice decît să și le explice. Explicația dată de Pasteur fenomenului de imunitate dobîndită dezvăluie pe de-a-ntregul chimistul din el. Imaginîndu-și organismul ca un flacon ce conține un mediu de cultură utilizabil de către microorganisme, Pasteur considera că primul atac microbian asupra organismului consumă din acest mediu elemente nutritive esențiale, ceea ce face ca la repetarea atacului micile „bestii" să nu mai găsească hrana necesară dezvoltării lor și astfel să nu poată provoca boala. Această ipoteză, numită *a epuizării*, pe care a formulat-o Pasteur în 1880, așa naivă cum ne apare astăzi, rămîne totuși prima încercare de a răspunde la întrebarea cu care am deschis acest capitol.

Al doilea răspuns a fost dat cîțiva ani mai tîrziu (1887) de Mecinikov, care a utilizat în acest scop teoria sa asupra rolului fagocitelor în imunitate. Mecinikov explica imunitatea ca rezultînd din lupta dintre fagocitele organismului și agentul patogen. Acest mecanism de apărare a organismului concură, indiscutabil, la realizarea imuni-

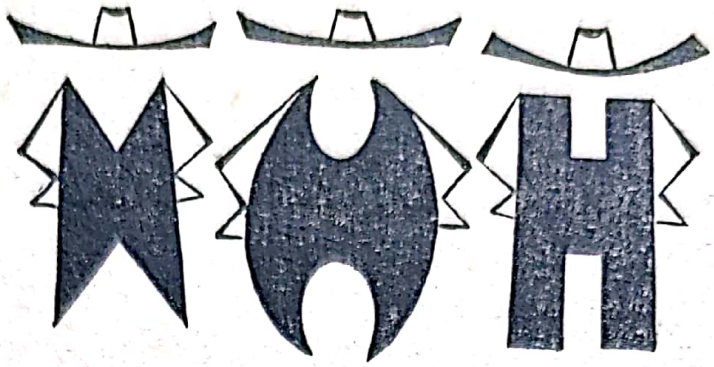
Scanned with OKEN Scanner

tății naturale și nimeni dintre imunologii de astăzi n-ar îndrăzni să conteste acest fapt. Dar părerea lui Mecinikov, potrivit căreia imunitatea dobîndită se datorează „antrenării" fagocitelor în urma primului contact cu agentul patogen poate fi considerată cel mult ingenioasă și cam atît. Trebuie să spunem însă că, spre cinstea lui Mecinikov, el a susținut mai puțin această ipoteză, în contrast cu vehemența cu care și-a apărat teoria fagocitară a imunității naturale. De fapt, ipoteza antrenării fagocitelor i-a fost smulsă „în focul luptei" cu acei cercetători care reclamau în imunitate: totul pentru sînge și nimic pentru fagocite!

În acea epocă, ideea că omul sau animalul nu fac boala la reinoculare, din cauză că primul contact al organismului cu agentul patogen determină apariția unor principii active în sînge capabile să anihileze acțiunea vătămătoare a microorganismului, plutea în aer, ea fiind sugerată de constatări făcute în diferite laboratoare. Contrar a ceea ce se crede în general, Mecinikov n-a negat niciodată rolul componentelor din sînge în imunitatea dobîndită, ci numai în cea naturală. Mai mult, în 1887 el observă că bacilii dalacului amestecați cu sîngele oilor imunizate împotriva dalacului nu produc boala dacă sînt inoculați unor animale sănătoase, ceea ce i-a sugerat chiar și lui ideea că sîngele trebuie să conțină „ceva" care împiedică dezvoltarea microorganismului și a bolii.

N-a trecut nici un an de la constatarea lui Mecinikov și alți doi pasteurieni, medicii Richet și Herricourt, au arătat că serul scos din sîngele

Scanned with OKEN Scanner



Trei anticorpi cu trei specificităţi imunologice

unor cîini care fuseseră injectaţi cu stafilococ este capabil să vindece iepurii de casă îmbolnăviţi cu același germen. Adevărat însă că serul nu s-a dovedit întotdeauna eficace.

Un an mai tîrziu, în 1889, Babeș și Lepp au observat că, luînd sînge de la cîinii vaccinați antirabic și injectîndu-l unor cîini sănătoși, aceștia nu se mai îmbolnăveau de turbare dacă erau mușcaţi de animale bolnave.

Behring şi Landsteiner

Ideea formării în sînge a unor factori de apărare în urma îmbolnăvirii sau vaccinării era iminentă. Ea s-a materializat într-o formă coerentă în laboratorul bacteriologului german Behring în 1890, anul care consemnează descoperirea anticorpilor. Behring și Kitasato au dovedit că starea de imunitate față de toxina tetanică, care se instituie prin injectarea repetată a acestei toxine unui animal, se datorează dezvoltării în sîngele acestuia a unei substanțe specifice, neutraliza-

Scanned with OKEN Scanner

toare, care a fost numită *antitoxină*. Puțin mai tîrziu, tot Behring și-a extins cercetările și asupra toxinei difterice, ajungînd la concluzia că este vorba de un fenomen general. Aceste antitoxine au fost numite curînd cu termenul general de *anticorpi*, o prescurtare care definește acțiunea lor dirijată, așa cum se credea atunci, împotriva corpilor microbieni. Această limită a fost repede lărgită. În 1891, imunologul german Ehrlich a arătat că animalele sînt capabile să producă anticorpi și față de toxine, care nu au nimic comun cu bacteriile, cum ar fi, de exemplu, ricina, o substanță proteică toxică extrasă din semințele de ricin. În 1897, imunologul german Kraus a observat că un filtrat limpede dintr-o cultură bacteriană, care nu a avut nici măcar un singur microorganism în el, poate induce, după injectare la animal, sinteza de anticorpi capabili să formeze un precipitat dacă se adaugă filtratului întrebuințat la imunizare. La scurt timp de la această descoperire, numeroși cercetători au semnalat că astfel de anticorpi pot fi obținuți fără nici o dificultate după injectarea animalelor cu o mare varietate de proteine sau polizaharide.

Injectînd cobailor sînge de iepure, imunologul belgian Bordet a constatat că în serul acestora apar anticorpi capabili să se combine cu globulele roșii din sîngele de iepure. Dar să dăm cuvîntul descoperitorului să povestească această frumoasă experiență efectuată în 1898: „Administrînd cobailor, la intervale de o săptămînă, trei sau patru injecții cu sînge de iepure și sîngerînd animalele la 10 zile de la ultima injecție, am constatat că serul lor nu numai că *aglutina*

Scanned with OKEN Scanner

puternic globulele roșii de iepure, dar le și distrugea foarte repede. De exemplu, dacă se pune pe o sticlă de ceas o picătură de sînge de iepure și 2—3 picături de ser de cobai imunizat, globulele roșii se adună aproape imediat în pachete; acest aspect nu durează prea mult și după 2—3 minute maldărele de globule par a se topi, în timp ce amestecul se limpezește și seamănă cu un sirop de coacăze". Privite la microscop, se constată că eritrocitele s-au făcut praf; de aceea fenomenul a fost denumit *hemoliză*. Iată deci că în sîngele cobailor imunizați au apărut anticorpi capabili să reacționeze cu globulele roșii din sîngele iepurilor. Punînd în contact însă sîngele acestor cobai cu globule roșii obținute de la alte specii (pasăre, oaie, vacă etc.) nu se produce nimic, nici aglutinare și nici hemoliză. De asemenea, serul oilor imunizate cu toxina tetanică neutralizează toxina tetanică, dar nu și pe cea difterică. Aceste constatări, peste care s-au adunat repede altele privitoare la proteine de diferite origini, au permis introducerea noțiunii de *specificitate*, care desemnează capacitatea anticorpilor de a reacționa numai cu substanța care a fost întrebuințată pentru producerea lor.

Nu trecuseră nici zece ani de la descoperirea anticorpilor și materialul faptic adunat în entuziasmul general al cercetătorilor arată că cele mai diferite substanțe și microorganisme pot produce anticorpi dacă sînt injectate într-un animal: microbi, toxine microbiene, globule roșii, proteine de origine microbiană, vegetală și animală. Toate aceste „materiale" au fost cuprinse sub numele general de *antigene*, termen care a fost creat de

Scanned with OKEN Scanner

bacteriologul maghiar Deutsch în 1899. El derivă de la cuvîntul grecesc *antigennein* și înseamnă „a da naștere împotrivă". Deci antigene pot fi considerate acele substanțe care, introduse în organismul unui animal vertebrat, dau naștere la anticorpi.

Cunoștințele noastre asupra naturii fizice și chimice a antigenelor au progresat rapid. Este suficient să amintim că deja în 1917, grație lucrărilor lui Landsteiner, se știa că se pot produce anticorpi dirijați împotriva oricărei grupări chimice, cu condiția ca aceasta să fie legată de un suport proteic. Aceste cercetări au permis să se tragă concluzii foarte importante, printre care ar fi și aceea că specificitatea antigenelor nu este dată de întreaga lor moleculă, ci numai de o parte a ei, care a căpătat denumirea de *grupare determinantă*. Cercetările privitoare la asemănarea chimică dintre diferite grupări determinante au dus la concluzia că specificitatea reacției dintre antigen și anticorp nu este absolută, ci pot exista *reacții încrucișate*. De exemplu, dacă se injectează albumina serică umană la un iepure, se constată că anticorpii formați sînt capabili să reacționeze într-o măsură mai slabă, dar concludentă, cu albumina serică de maimuță.

Aceste descoperiri și aplicații privind cunoașterea mai aprofundată a antigenelor și a unor reacții antigen-anticorp au fost realizate utilizînd anticorpii ca principal instrument de cercetare. Dar, așa cum se întîmplă de obicei în aceste cazuri, instrumentul a suscitat mai puțin interes și progresele au fost, cel puțin în prima perioadă, imperceptibile. Dacă la trei ani de la descope-

Scanned with OKEN Scanner

rirea lor se știa deja de anticorpi că se concentrează în fracțiunea globulinică a serului, a trebuit să treacă mai bine de 37 de ani (!) pentru ca această concluzie să fie considerată indiscutabilă. Este meritul americanilor Haurowitz și Heidelberger de a fi arătat, în 1930, că anticorpii sînt simple proteine serice de natură globulinică care nu cuprind nici un fel de compus chimic misterios și sofisticat. Această stagnare a cunoștințelor despre natura chimică a anticorpilor a fost funestă și pentru celelalte fațete ale problemei, cum ar fi: modul lor de formare în organism și felul în care se realizează comuniunea antigen-anticorp în cursul reacțiilor specifice. Ea se explică în primul rînd prin împrejurarea că chimia proteinelor era abia în perioada copilăriei sale neîndemînatice. De aceea, cercetătorii nu au avut la dispoziție un material faptic suficient de concludent pentru a îndepărta suspiciunea că anticorpii sînt numai niște substanțe (de natură necunoscută) asociate cu proteinele.

Era modernă

Descoperirea metodelor de fracționare a proteinelor după sarcina lor electrică (electroforeza) și greutatea lor moleculară (ultracentrifugarea) a avut o repercusiune imediată asupra cunoașterii mai intime a naturii anticorpilor. În 1938, suedezul Tiselius și americanul Kabat au arătat, prin electroforeză, că anticorpii aparțin unei familii de proteine cunoscute sub numele de gamma-

Scanned with OKEN Scanner

globuline serice. În același an, Heidelberger aplică ultracentrifugarea la studiul anticorpilor și constată că în sîngele animalelor injectate cu un antigen oarecare se formează două feluri de anticorpi: unii cu greutate moleculară de 150 000 și alții cu o greutate moleculară în jur de un milion.

Cu acest moment se poate considera că începe era modernă. Abia se uscase cerneala comunicărilor prin care se dovedea că anticorpii sînt gamma-globuline, și chimistul american Pauling (1940—1943) elaborează teoria sa conform căreia moleculele de anticorpi sînt niște gamma-globuline „modificate puțin" sub influența antigenului, astfel ca ele să se poată combina specific cu acesta. Experiențele declanșate de teoria sa au dovedit că numai o mică parte din molecula anticorpilor participă la legarea antigenului, această parte fiind numită *situs de combinare*. Pauling și Karush au dovedit că anticorpii cu greutate moleculară de 150000 au două situsuri de combinare în moleculă, fundamentînd astfel ideea bivalenței anticorpilor. Apare acum clar că interacțiunea antigen-anticorp se limitează, de fapt, la interacțiunea dintre grupările determinante ale antigenului și situsurile de combinare ale anticorpului.

Descoperirea unor noi metode cromatografice de purificare a proteinelor și perfecționarea metodelor electroforetice au permis un salt înainte: izolarea și purificarea înaintată a anticorpilor. Începe asaltul asupra cetății inexpugnabile: structura chimică a anticorpilor. Între 1959 și 1964, Porter, Edelman ș.a. descompun cu răbdare molecula anticorpilor și prezintă primul model văzut cu ochii minții lor. Apare clar tuturor că anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpii sînt alcătuiți din două perechi de lanțuri polipeptidice distincte, care se înfășoară strîns în molecula anticorpilor, formînd la extremitățile ei cele două situsuri de combinare. Între timp, dezlegarea șaradei secvenței (ordinii) aminoacizilor în structura anticorpilor progresa grație eforturilor unei armate de chimiști risipiți pe întreg globul. Și în anul 1970 o veste a sosit în laboratoare: la Institutul „Rockefeller" din New York, profesorul Edelman a determinat secvența completă în aminoacizi a unei molecule de anticorp. Un acord final la o operă lungă? Nicidecum, abia se cîntă uvertura!

Scanned with OKEN Scanner

2

În care se face o digresiune despre proteine și acizii nucleici cu scopul de a netezi drumul spre cunoașterea anticorpilor

Anticorpii sînt proteine. Multe antigene sînt proteine. Reacția antigen-anticorp este de multe ori o reacție între două proteine. Dar ce sînt, la urma urmei, proteinele? Răspunsul la întrebare a născut ideea acestei digresiuni.

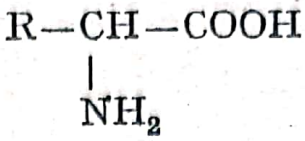
Proteinele sînt substanțe care se formează prin legarea — unul de celălalt — a unui număr mai mare sau mai mic de aminoacizi. Într-o moleculă de proteină se găsesc 19—20 de feluri de aminoacizi, dar fiecare fel de aminoacid se poate găsi o dată sau repetat de mai multe ori, astfel că proteina poate conține cîteva sute (sau chiar mii) de aminoacizi.

Aminoacizii

Aminoacizii au o structură asemănătoare, în sensul că conțin în molecula lor o grupare aminică, bazică (NH_2) și una carboxilică, acidă

Scanned with OKEN Scanner

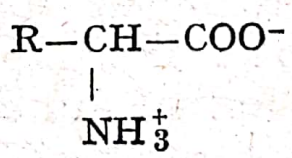
(COOH). Sub forma sa cea mai generală, un aminoacid se poate scrie astfel:



Cu R s-a notat restul moleculei de aminoacid care este caracteristic pentru fiecare din cei 20 de reprezentanți. El este acela care dă aminoacidului „buletinul său de identitate". Astfel, dacă:

R = H	aminoacidul	se	numește	glicocol
R = CH_3—	„	„	„	alanină
R = HO— —CH_2—	„	„	„	tirozină
R = HS—CH_2—	„	„	„	cisteină
R = HO—CH_2—	„	„	„	serină [1]

Prezența concomitentă în molecula aminoacidului a două grupări opuse poate fi scrisă astfel ca sarcina lor electrică să fie evidentă:



[1] Dăm mai jos numele tuturor aminoacizilor. În paranteză am cuprins prescurtarea lor, așa cum se întîlnește în cărțile de biochimie: alanină (ala), arginină (arg), acid aspartic (asp), acid glutamic (glu), asparagină (asn), glutamină (gln), cisteină (cys), cistină (cys-cys), glicocol (gly), histidină (his), izoleucină (ile), leucină (leu), lizină (lys), metionină (met), fenilalanină (phe), prolină (pro), serină (ser), treonină (tre), triptofan (thr), tirozină (tyr) și valină (val).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă aminoacidul este pus în mediu acid, el se va găsi în prezența unui exces de ioni de hidrogen; aceștia se vor adiționa la gruparea $-COO^-$, pe care o vor transforma în grupare $-COOH$. Întreaga moleculă a aminoacidului va primi în acest caz sarcina pozitivă a grupării $-NH_3^+$ și va funcționa ca bază. În mediu alcalin, ionii de oxidril $-OH$ scot un hidrogen de la gruparea aminică, care devine neîncărcată, molecula rămînînd numai cu sarcina negativă dată de gruparea carboxil $-COO^-$ și funcționînd deci ca acid. Datorită posibilității de a-și schimba sarcinile electrice în funcție de pH, aminoacizii au o mare reactivitate, pe care o transmit și proteinelor în a căror componență intră.

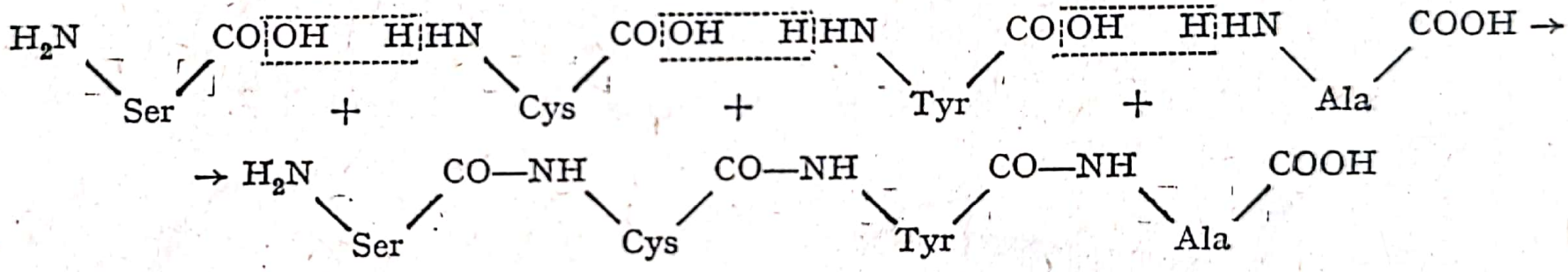
Lanțurile polipeptidice

Legarea aminoacizilor în molecula unei proteine se realizează prin intermediul grupărilor carboxilice și aminice care formează o legătură numită *peptidică*. Această legătură ia naștere prin eliminarea unei molecule de apă între cele două grupări opuse (v. pag. 19).

Lanțul peptidic format are două capete: unul care poartă gruparea aminică liberă (ser) și se numește capăt *N-terminal*, iar celălalt care are gruparea carboxil liberă (ala) și se numește capătul *C-terminal*. Succesiunea aminoacizilor într-un lanț peptidic se numește *secvență* și determină *structura primară* a lanțului respectiv.

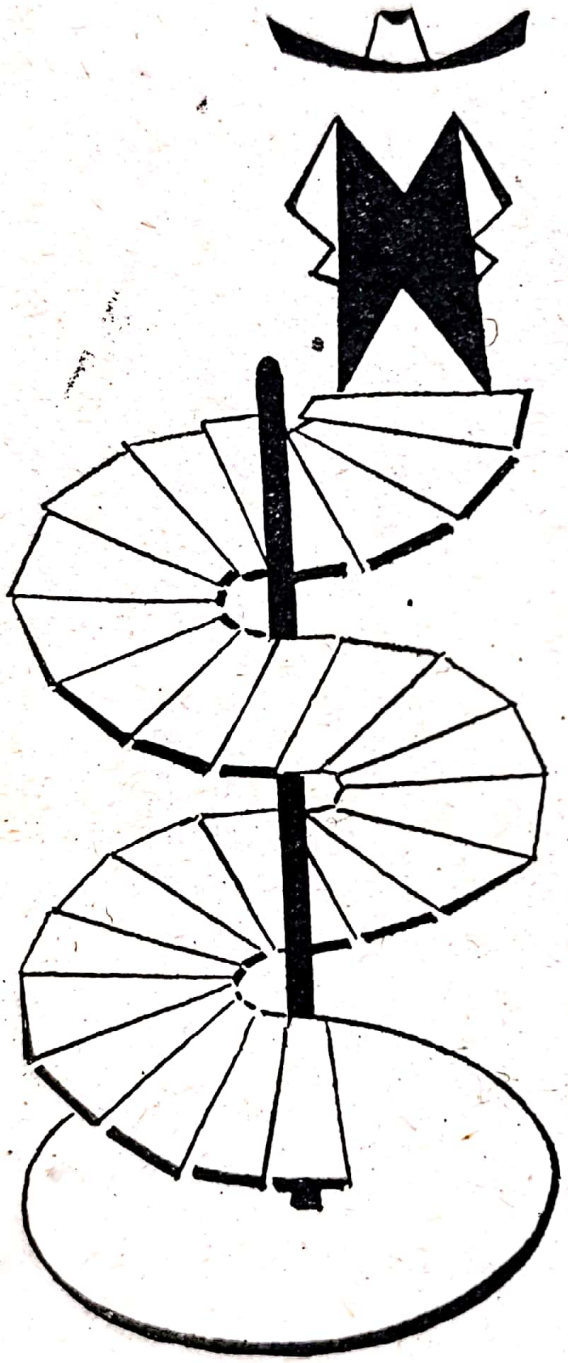
Moleculele proteice sînt alcătuite din astfel de lanțuri peptidice cu lungimi variabile. Spunem

Scanned with OKEN Scanner



Legătură peptidică

lanțuri *polipeptidice* tocmai ca să subliniem că ele sînt alcătuite din numeroase, foarte numeroase legături peptidice. Astfel, insulina este formată din două lanțuri polipeptidice, unul avînd 21 de aminoacizi și celălalt 30 de aminoacizi; lizozimul este compus din 129 molecule de aminoacizi etc.



Anticorpul pe treapta de sus a organizării moleculei de proteină

Să ne imaginăm lanțul polipeptidic ca un colier pe care sînt înșirați, ca niște perle, aminoacizii. Luînd în mînă acest colier, vom putea să-i dăm cele mai neobișnuite forme: împletit în două, ca o frînghie marinărească, strîns în mîini ca un bulgăre rotund de zăpadă, ținut în căușul palmei ca un ou. Tot așa și lanțul polipeptidic poate lua în spațiul celor trei dimensiuni cele mai diferite forme, cu deosebire că așezarea lui ascultă de o lege arhitectonică fixă. Astfel, lanțul polipeptidic are forma unei scări în spirală, în care 3 — 5 aminoacizi corespund

Scanned with OKEN Scanner

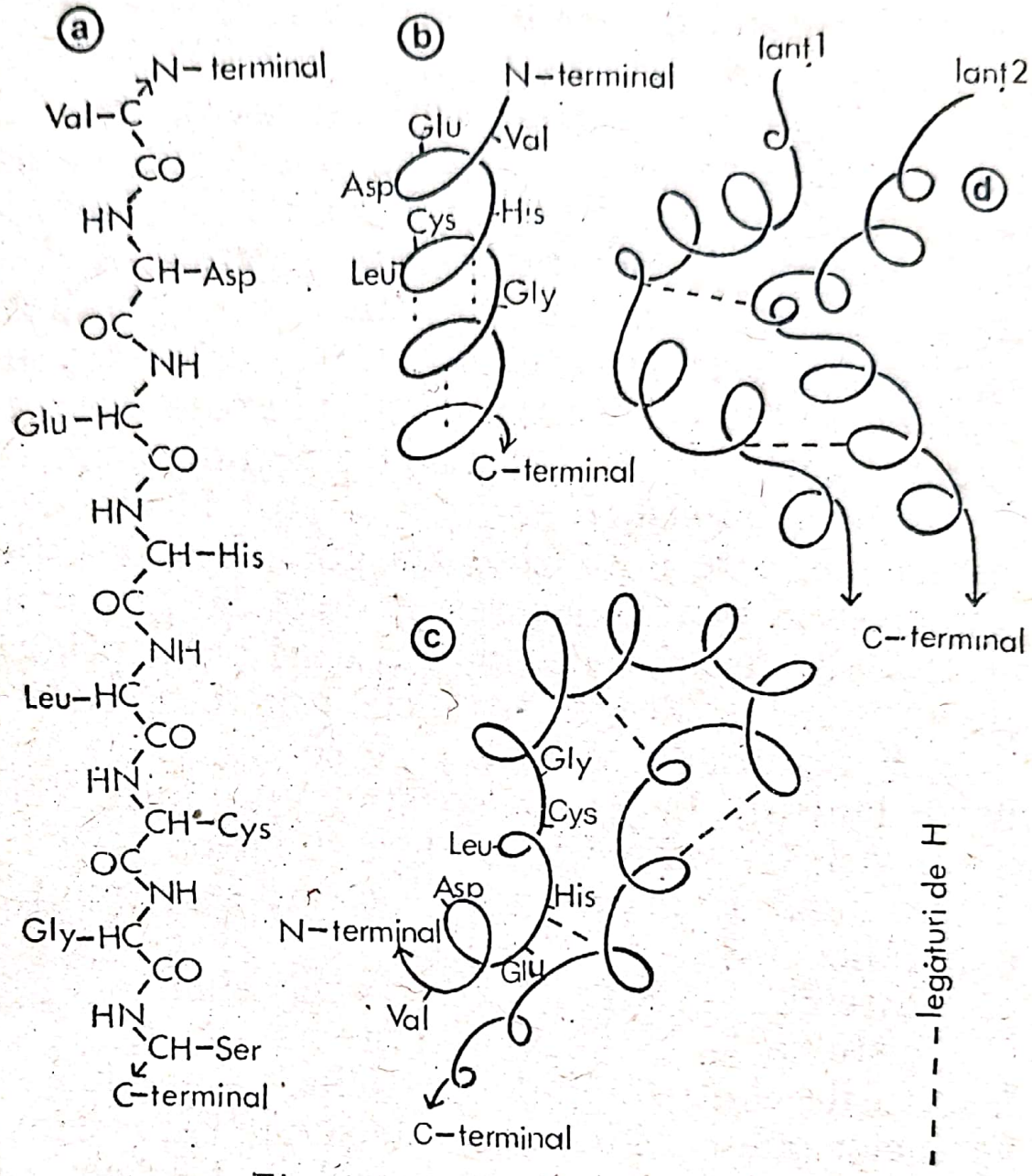


Fig. 1. — Structurile proteinelor

a. Secvența aminoacizilor într-un lanț polipeptidic extins (structura primară); *b.* așezarea aminoacizilor în spirală (structura secundară); *c.* plierea lanțului polipeptidic spiralat (structura terțiară); *d.* legarea a două lanțuri polipeptidice (structura cuaternară).

unei spirale. În figură s-a desenat un astfel de model elicoidal care are o șiră a spinării elegant spiralată. Stabilitatea „construcției" este asigurată de legăturile care se formează între grupările —CO— și —NH— aparținînd unor spirale suprapuse. Dacă

Scanned with OKEN Scanner

secvența aminoacizilor într-o proteină reprezintă structura ei primară, așezarea aminoacizilor într-o spirală reprezintă *structura secundară*. Catena polipeptidică ne apare deci ca o coloană vertebrală de care sînt fixate resturile R ale diferiților aminoacizi, îndreptate spre exterior. Aceste resturi leagă la rîndul lor, între ele, diferitele părți ale spiralelor care alcătuiesc un lanț polipeptidic și fac ca acestea să se plieze și contorsioneze foarte mult. Aceste interacțiuni concură la formarea *structurii terțiare* a proteinelor. Tot resturile R care împînzesc marginile spiralei sînt responsabile pentru legarea a două lanțuri unul de celălalt. Astfel, cele două lanțuri polipeptidice ale insulinei se leagă între ele prin intermediul a două resturi de cisteină care se găsesc pe cele două lanțuri. Legătura se stabilește între cele două grupări sulfhidrilice ale cisteinelor (—SH), determinînd formarea unei legături sau „punți" disulfidice (—S—S—), astfel:

cisteină — SH + HS — cisteină =
cisteină — S — S — cisteină + H_2.

Legăturile dintre spirale participă la îmbinarea catenelor polipeptidice între ele și duc la formarea *structurii cuaternare* a proteinelor. Desigur că această structură o pot reprezenta numai proteinele compuse din cel puțin două lanțuri polipeptidice, cum sînt anticorpii, hemoglobina, insulina ș.a.

Nu trebuie însă să uităm că grupările carboxilice și aminice cuprinse în radicalii R aflați la exteriorul spiralei conferă moleculei proteice sarcina electrică. Ar fi greșit să socotim însă că încărcarea electrică globală a unei molecule pro-

Scanned with OKEN Scanner

teice este suma tuturor sarcinilor sale aminice (pozitive) și carboxilice (negative) libere. O bună parte din acestea se atrag reciproc și se neutralizează în interiorul moleculei proteice și astfel numai acea parte din grupările aminice și carboxilice pe care plierea catenei polipeptidice le orientează spre suprafața moleculei determină semnul și mărimea sarcinii electrice a proteinei date.

O moleculă proteică oarecare are o sarcină electrică caracteristică, care depinde de numărul și secvența aminoacizilor. De aceea, într-un amestec complex de proteine cum este serul sanguin se pot separa individualități distincte din punctul de vedere al sarcinilor electrice cu ajutorul metodei electroforetice. Astfel, aplicînd pe o hîrtie de filtru umezită o picătură de ser sanguin și supunînd această hîrtie unui cîmp electric, nu numai că se separă albumina de globuline, dar acestea din urmă se subfracționează în cel puțin trei componente numite *alfa-*, *beta-* și *gamma-globuline*. Să ne reamintim că anticorpii dintr-un ser se regăsesc în zona gamma-globulinelor.

Fabrica de proteine și acizii nucleici

Proteinele sînt sintetizate de toate celulele. În fiecare celulă se găsește o „fabrică" mai mare sau mai mică de proteine care asamblează aminoacizii în proteine necesare uzului propriu sau întregului organism.

Scanned with OKEN Scanner

Sinteza proteinelor are loc în celulă la nivelul *reticulului endoplasmatic* (vezi figura 2). Acesta este un fel de labirint întortocheat care se întinde

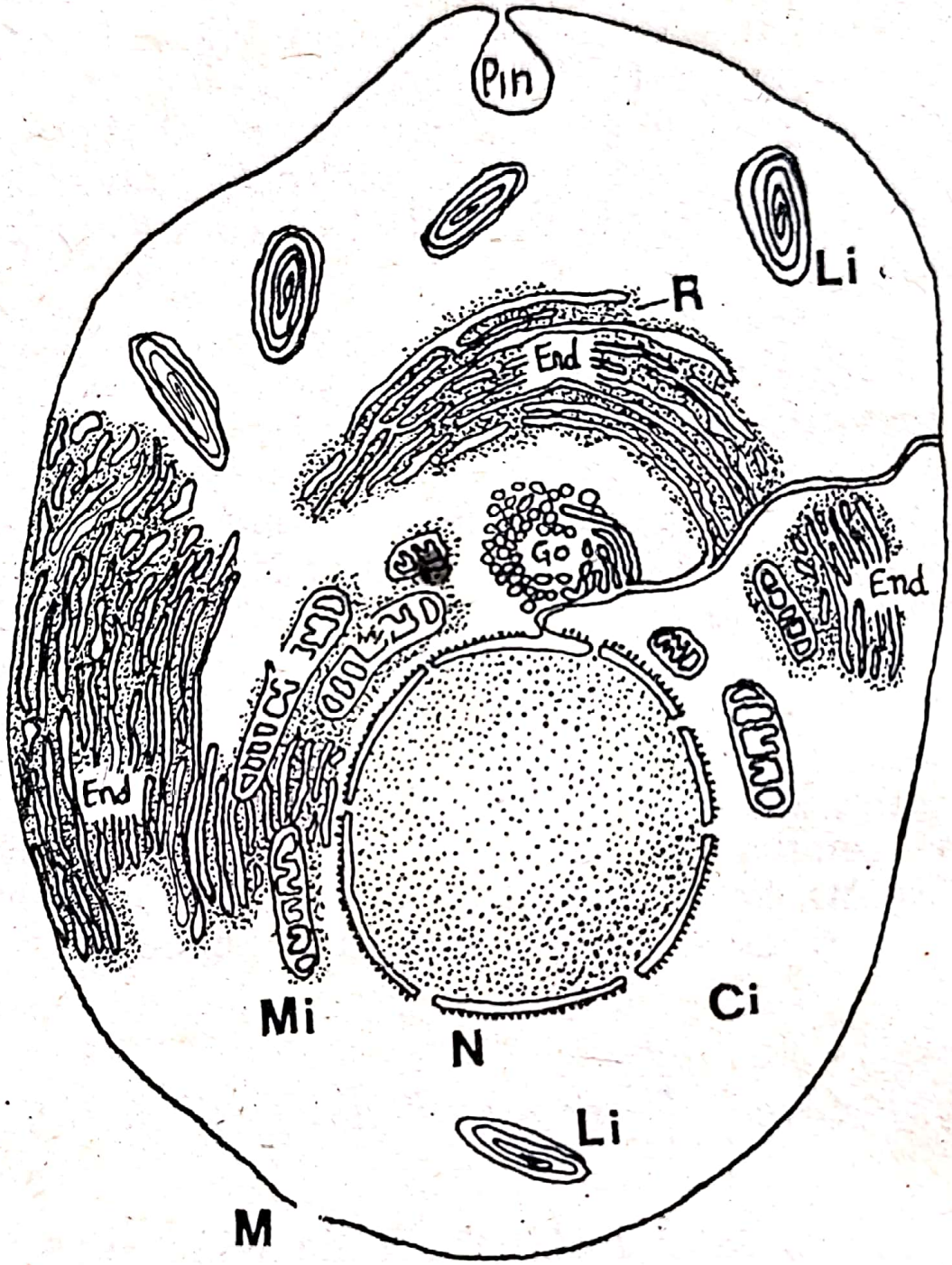


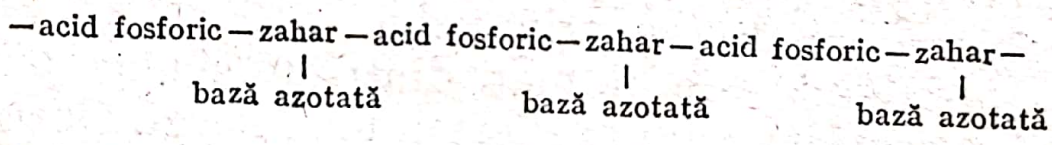
Fig. 2 — Diagrama schematică a ultrastructurii unei celule care secretă anticorpi

N. Nucleu; Mi. Mitocondrie; Li. Lizozom; End. Reticul endoplasmatic; R. Ribozom; Go. Aparatul lui Golgi; Ci. Citoplasmă; Pin. Invaginație pinocitară; M. membrană.

Scanned with OKEN Scanner

ca o pînză de păianjen în întreaga citoplasmă, de la nucleu și pînă la membrană. Canaliculele reticulului endoplasmatic sînt pavate cu mici granule rotunde numite *ribozomi*. Aici se prepară proteinele. În jurul ribozomilor roiesc, ca albinele la stup, aminoacizii. Legarea lor unul de celălalt, pentru formarea lanțului polipeptidic, este guvernată de atotputernicii acizi nucleici, a căror biografie trebuie bine studiată pentru a putea înțelege modul în care se formează proteinele.

Acizii nucleici sînt substanțe alcătuite din sute și chiar mii de nucleotide. La rîndul lor, nucleotidele cuprind trei componente: *acid fosforic*, un *zahar* și o *bază azotată*. Nucleotidele se leagă între ele printr-o combinație între zahar și acidul fosforic, combinație care alcătuiește coloana vertebrală a moleculei. Redăm un fragment de lanț polinucleotidic:



Bazele azotate se ancorează de zahar. Se cunosc cinci baze azotate principale: *timina* (T), *citozina* (C), *uracilul* (U), *adenina* (A) și *guanina* (G).

Există două feluri de acizi nucleici: acid *dezoxiribonucleic* (ADN), care se găsește în nucleul celulelor, și acid *ribonucleic* (ARN), stocat în nucleu, dar și în citoplasma celulelor. Deosebirea dintre ADN și ARN constă în natura chimică a zaharului și a bazei azotate care îi compun: ADN-ul conține ca zahar dezoxiriboza și T, C, A și G ca baze azotate, iar ARN-ul este alcătuit din riboză și aceleași baze azotate, cu excepția

Scanned with OKEN Scanner

T în locul căreia se găsește U. Atît ADN-ul cît și ARN-ul sînt formați din lungi catene polinucleotidice.

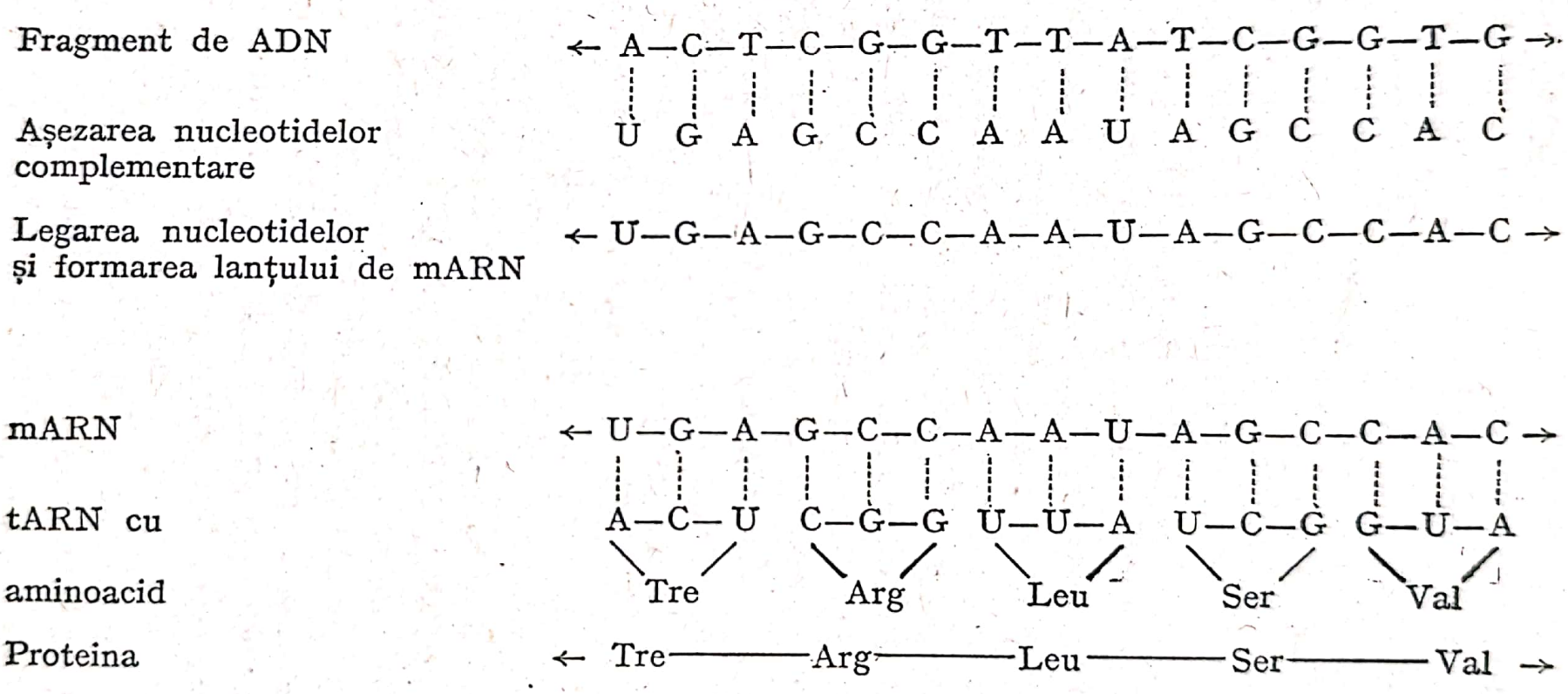
Molecula de ADN este formată din două lanțuri polinucleotidice în spirală, răsucite în jurul unui ax comun, tot așa cum un șnur de mărțișor este împletit dintr-un fir alb și altul roșu. Cele două lanțuri polinucleotidice sînt ținute împreună datorită unor punți speciale „de hidrogen" care se stabilesc între perechi determinate de baze azotate, totdeauna aceleași: A (sau U în ARN) cu T și G cu C. Aceste perechi sînt cunoscute sub numele de *baze complementare*.

ARN-ul este format dintr-o singură catenă polinucleotidică, dar ea se poate îndoi astfel încît să formeze uneori o structură dublu spiralată asemănătoare ADN-ului. S-au identificat pînă acum trei categorii de ARN: *mesager* (*mARN*), de *transfer* (*tARN*) și *ribozomal* (*rARN*). Vom vorbi numai despre primii doi.

mARN-ul este format dintr-un singur lanț polinucleotidic, care are forma unei benzi. Bazele azotate sînt așezate numai pe o parte a benzii, așa cum stau dinții unui pieptene. Ordinea nucleotidelor în catenă, pentru un mARN dat, este dictată de ADN-ul corespunzător. Ea se realizează în cîteva etape. Întîi se derulează cele două lanțuri spiralate ale ADN-ului. Pe unul din ele se așază nucleotidele complementare (vezi pag. 27).

Nucleotidele viitorului mARN se așternumai pe o porțiune a lanțului de ADN desfășurat, deoarece mARN-ul este de cîteva zeci de ori mai scurt decît ADN-ul. Această *porțiune suport* din molecula de ADN se numește *cistron*.

Scanned with OKEN Scanner


Fragment de ADN
← A—C—T—C—G—G—T—T—A—T—C—G—G—T—G →
Așezarea nucleotidelor complementare
U G A G C C A A U A G C C A C
Legarea nucleotidelor și formarea lanțului de mARN
← U—G—A—G—C—C—A—A—U—A—G—C—C—A—C →
mARN
← U—G—A—G—C—C—A—A—U—A—G—C—C—A—C →
tARN cu
A—C—U C—G—G U—U—A U—C—G G—U—A
aminoacid
Tre Arg Leu Ser Val
Proteina
← Tre——Arg——Leu——Ser——Val →

tARN-ul este cel mai mic dintre acizii nucleici, are o greutate moleculară mică, fiind compus numai din 77 de nucleotide. Numele pe care îl poartă îi revine pe merit: el este cărăușul aminoacizilor pe care îi adună din toate colțurile celulei și îi transportă pînă la fabrica de proteine din ribozomi. Fiecărui aminoacid din cei 20 pe care i-am amintit îi corespunde cîte un tARN specific. Deci într-o celulă se găsesc 20 feluri de tARN, care se deosebesc unii de alții și printr-o *secvență specifică de trei nucleotide.* În funcție de această *tripletă,* un anumit tARN se poate lega, la una din extremitățile sale, numai cu unul din cei 20 de aminoacizi. O dată legat, aminoacidul este transportat la ribozomi. Ajunși în acest punct, să abandonăm biografia sumară a acizilor nucleici și să ne reîntoarcem la felul în care se sintetizează proteinele într-o celulă.

ARN-ul mesager sosește la nivelul ribozomilor venind de la nucleu pe calea reticulului endoplasmatic. În nucleu el a copiat o porțiune bine definită din lanțul polinucleotidic al ADN-ului, și anume aceea care ordonă sinteza unei proteine date. Întinzîndu-și banda peste cîțiva ribozomi și dîndu-le aspectul de mărgele înșirate pe o ață *(poliribozomi),* ARN-ul mesager își oferă nucleotidele ARN-ului de transfer.

Așezarea moleculelor de tARN pe nucleotidele mARN-ului nu are loc la întîmplare, ci se face într-o ordine care este dictată de complementaritatea celor 3 baze ce alcătuiesc tripleta tARN-ului. Scriind din nou porțiunea de mARN prezentată mai sus, vom putea așeza moleculele de tARN numai astfel ca tripletele lor să fie

Scanned with OKEN Scanner

complementare la grupuri de cîte 3 nucleotide din mARN (vezi pag. 27).

Se observă că dacă în mARN există un triplet *UGA* atunci pe el se poate așeza numai un tARN care are tripletul complementar *ACU* și care are legat de el treonina. Tripletele de nucleotide din mARN se numesc *codoni*, iar cele din tARN *anticodoni*.

Astfel se așază unul lîngă altul toți tARN, cu aminoacizii legați de ei, pînă ce banda de mARN este completată. Pe măsură ce ei se așază, aminoacizii lor se leagă unul de celălalt, formînd legăturile peptidice. Cînd ultimul tARN s-a așezat pe ultimul triplet al mARN-ului și aminoacidul pe care-l purta s-a legat de ceilalți aminoacizi deja uniți, lanțul polipeptidic se desprinde de pe ribozom și proteina este *in statu nascendi*. Eliminată în „cisternele" reticulului endoplasmatic, proteina începe să se plieze după afinitatea care există între diferitele resturi de aminoacizi și, în scurt timp, ea este gata de funcționare, fiind expediată dincolo de porțile „fabricii" de proteine.

Recapitulînd cele spuse, trebuie să rămînem cu ideea că sinteza fiecărei proteine este hotărîtă în nucleu de către porțiuni determinate din ADN numite *cistroni*. Cîți cistroni există în ADN-ul nuclear atîtea feluri de proteine vor fi sintetizate în ribozomi. Sinteza lor se realizează prin intermediul mARN-ului care „copiază" cistronul ADN-ului și îl înscrie în propria sa moleculă. ARN-ul mesager participă la construirea edificiului proteic prin intermediul ARN-ului de transfer, care are rolul de a ordona aminoacizii

Scanned with OKEN Scanner

în secvența impusă de mesajul pe care mARN-ul îl aduce de la nucleu. Din acest motiv este clar că o proteină ca albumina serică are în celula hepatică un ADN și un mARN corespunzător. Desigur că raportul cantitativ dintre albumină și acizii nucleici ce o sintetizează nu trebuie să fie 1 : 1, deoarece un singur cistron poate fi copiat de mai mulți mARN și pe un mARN se pot sintetiza mai multe molecule de albumină. De asemenea, în citoplasmă există mai multe molecule de tARN decît aminoacizii care intră în compoziția albuminei, deoarece celula hepatică sintetizează cîteva sute de alte proteine, astfel că pe matrița mARN-ului se adună numai o mică parte din toate moleculele de tARN care se găsesc în citoplasmă.

Anticorpii fiind proteine și nimic altceva, este clar că și fabrica de anticorpi va funcționa ca orice altă fabrică de proteină din celulă, cu singura dar marea deosebire că va trebui să înțelegem cum se face că în molecula anticorpilor „se copiază" grupările determinante ale antigenelor. Dar aceasta este o problemă la care vom încerca să dăm un răspuns mai tîrziu.

Scanned with OKEN Scanner

3

În care cititorul este introdus într-un laborator de imunochimie și este îndemnat să privească mai îndeaproape anticorpii

Simbolul viu al laboratoarelor de imunochimie ar trebui să fie iepurele, animal inofensiv, pe a cărui suferință s-au clădit cunoștințele noastre asupra anticorpilor și de care sîntem atît de mîndri. Să luăm și noi acest „cal de bătaie" al laboratoarelor din lumea întreagă și să-i injectăm cîteva miligrame dintr-o proteină ce se extrage din albușul de ou, numită *ovalbumină*. Să repetăm de cîteva ori, săptămînal, această injecție și apoi, la o săptămînă de la ultima inoculare, să-i recoltăm din vena urechii prețiosul său sînge care conține anticorpii mult așteptați. Sîngele se introduce într-un termostat la 37°C și după scurt timp observăm că în eprubetă s-au petrecut evenimente însemnate: un lichid galben ca mierea s-a ridicat deasupra globulelor roșii închegate la fundul eprubetei. Este serul sanguin care, pe

Scanned with OKEN Scanner

lîngă anticorpii anti-ovalbumină [1], conține nu mai puțin de ... 50 de componente proteice.

Cum extragem anticorpii din acest brique-à-braque proteic? Cu bagheta magică a chimiei. Peste serul sanguin adăugăm încetul cu încetul o soluție saturată de sulfat de sodiu sau amoniu. Se observă la un moment dat că serul se tulbură și depune un precipitat alb, în care se găsesc anticorpii, împreună cu o mică cantitate din alte proteine serice. Acest precipitat este dizolvat într-o soluție tampon și apoi preparatul este trecut printr-o coloană de sticlă umplută cu un derivat de celuloză înzestrat cu însușirea de a face schimb ionic. Schimbătorul de ioni din coloană oprește din soluția proteică ce curge prin el toate proteinele, cu excepția anticorpilor, astfel că numai aceștia părăsesc coloana.

Să ne oprim aici puțin și să ne reamintim că chimistul suedez Tiselius și medicul american Kabat au arătat, încă acum douăzeci și mai bine de ani, că anticorpii aparțin unei clase de proteine care există și în sîngele animalelor neimunizate, numite gamma-globuline. Se pune deci întrebarea dacă în preparatul nostru se găsesc numai anticorpi, adică gamma-globuline capabile să se combine cu ovalbumina, sau și gamma-globuline „normale", care se află în sîngele oricărui iepure și care, evident, nu interacționează cu ovalbumina.

Într-adevăr, în preparatul nostru se găsesc alături de gamma-globuline anticorpi și gamma-

---

[1] Predilecția imunochimiștilor pentru prefixul *anti* face ca în limbajul lor laconic să se spună „anticorpi anti-ovalbumină" în loc de „anticorpi preparați prin injectarea unui animal cu ovalbumină".

Scanned with OKEN Scanner

globuline care nu reacționează cu ovalbumina. Deci în fața noastră se ridică o sarcină grea: cum să separăm din preparat anticorpii anti-ovalbumină de restul de gamma-globuline, știind că de fapt acest rest de gamma-globulină „normală" nu este altceva decît tot un amestec de anticorpi care s-au format în organismul iepurelui, încetul cu încetul, în tot cursul vieții sale, în urma faptului că el a intrat în contact cu diferiți factori de mediu patogeni sau nepatogeni [1]. În treacăt fie spus, această concepție a făcut ca astăzi gamma-globulinele să fie denumite *imunoglobuline*, termen care subliniază participarea acestor proteine la fenomenele de imunitate dobîndită.

Rezolvarea este mai simplă decît s-ar putea bănui. Dacă diferența dintre anticorpii anti-ovalbumină și imunoglobulinele normale ale iepurelui constă numai în aceea că primii sînt capabili să se combine cu ovalbumina, atunci se adaugă soluției care s-a scos din coloana de schimbător de ioni o anumită cantitate de antigen. Acesta, combinîndu-se cu anticorpul, va forma un precipitat ce se va așeza frumos pe fundul eprubetei, în timp ce în soluție vor rămîne imunoglobulinele normale.

Precipitatul ce conține ovalbumină și anticorpii specifici este supus apoi unei operații de

---

[1] În favoarea ideii că într-un ser normal toate gamma-globulinele sînt anticorpi pot fi aduse experiențele recente ale imunologului cehoslovac Sterzl, care a arătat că purceii scoși din uter prin cezariană, crescuți și alimentați cu hrană sterilă, nu formează decît o cantitate foarte mică de gamma-globuline.

Scanned with OKEN Scanner

„chirurgie chimică", cînd, cu ajutorul unui acid, cei doi componenți se desfac unul de celălalt. Eliminarea antigenului din soluția acidă a dat întotdeauna chimistului multă bătaie de cap. În ultimul timp s-a găsit o ingenioasă soluție de laborator pentru realizarea acestei operații. Astfel se fixează, cu ajutorul unor legături chimice, antigenul de un suport care are proprietatea de a fi insolubil în soluții apoase acide sau alcaline. În acest scop se folosește, de obicei, tot un derivat de celuloză. Antigenul fixat de

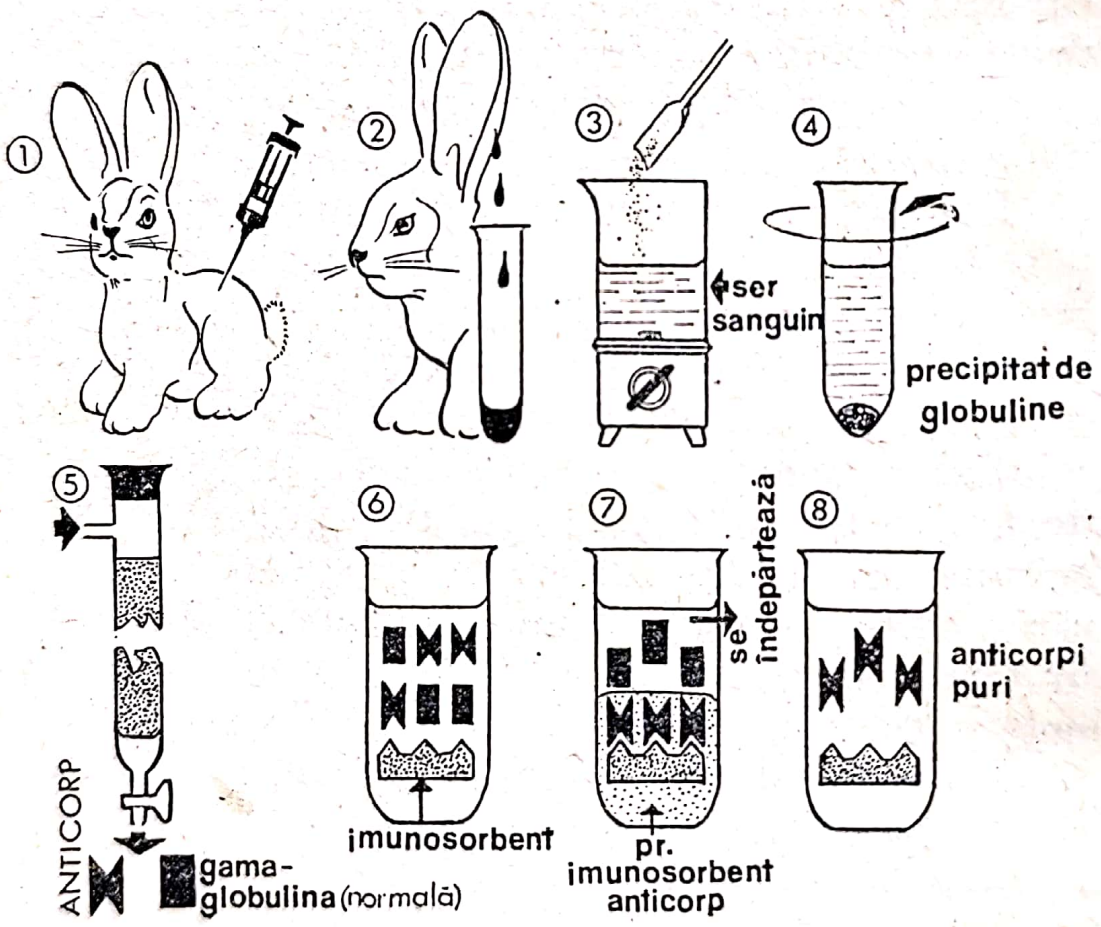
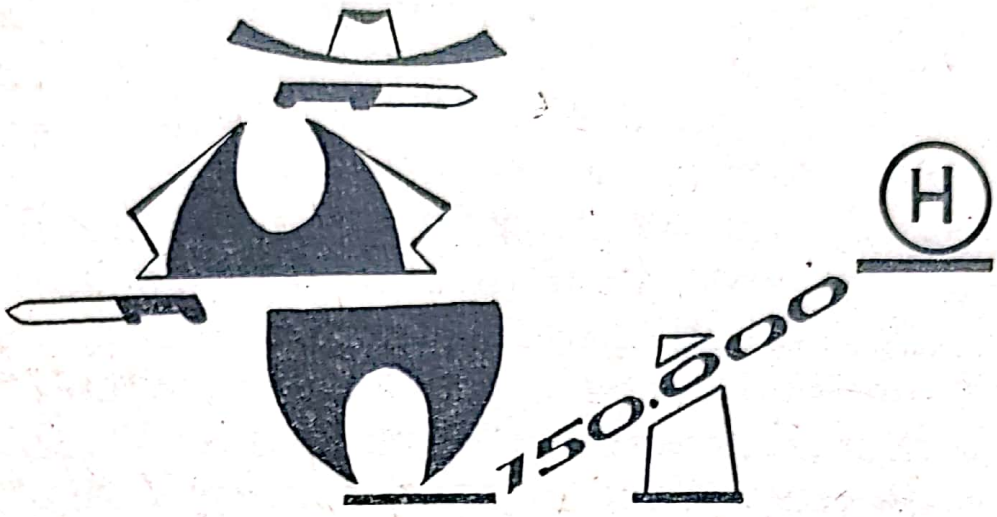


Fig. 3 — Etapele de obținere a anticorpilor

1. Imunizarea animalului; 2. recoltarea sîngelui; 3. precipitarea globulinelor cu sulfat de amoniu; 4. separarea precipitatului globulinic; 5. cromatografia pe schimbătorul de ioni celulozic; 6—7. fixarea anticorpilor pe imunosorbent; 8. desfacerea anticorpilor de pe imunosorbent cu ajutorul unei soluții acide.

Scanned with OKEN Scanner



Anticorpul sub ascuțișul papainei

celuloză se introduce în soluția ce conține anticorpul. Acesta se fixează de *imunosorbentul*[1] insolubil și este scos din soluție. Imunosorbentul ce conține anticorpul fixat pe el este introdus acum în soluția acidă, care desface legătura antigen-anticorp. Cum antigenul este insolubil, este suficientă o simplă centrifugare pentru a-l îndepărta sub forma unui depozit pe fundul eprubetei; în lichidul ce plutește deasupra (supernatant) găsim, în sfîrșit, numai anticorpii puri (vezi figura 3).

Chirurgia chimică a anticorpului

Măsurînd cu ajutorul ultracentrifugii greutatea moleculară a anticorpilor anti-ovalbumină pe care i-am obținut puri, constatăm că ei sînt

1. Antigenul fixat de suportul insolubil s-a numit imunosorbent, pentru a desemna că el este capabil să absoarbă anticorpi din soluție printr-o reacție specifică.

Scanned with OKEN Scanner

de 150 000 de ori mai grei decît un atom de hidrogen. Un astfel de „monstru" nu putea fi analizat de chimiști decît tăiat în bucăți mai mici, ceea ce ne grăbim să facem și noi. Astfel, tratăm anticorpii noștri cu un agent chimic numit *mercaptoetanol*, care are însușirea miraculoasă de a desface legăturile disulfidice ce unesc două lanțuri polipeptidice. Rupem astfel molecula anticorpilor în două perechi de lanțuri polipeptidice una mai mare, iar cealaltă mai mică. Perechea, mai mare conține două lanțuri polipeptidice identice, care s-au putut „cîntări" ca avînd fiecare o greutate moleculară de 50 000. Perechea mai mică este mai ușoară, conținînd, de asemenea, două lanțuri polipeptidice identice, fiecare cu o greutate moleculară de 25 000. Deoarece o moleculă de anticorp este alcătuită din *două lanțuri polipeptidice „grele"*, prescurtate cu simbolul *H* (de la cuvîntul englezesc *heavy* = greu) și *două lanțuri polipeptidice „ușoare"*, prescurtate cu simbolul *L* (de la cuvîntul englezesc *light* = ușor), putem scrie acum formula generală a unui anticorp astfel: H_2L_2. Însumînd greutățile moleculare ale lanțurilor, regăsim întocmai greutatea moleculară a anticorpilor: $2 \times 50\,000 + 2 \times 25\,000 = 150\,000$, dovada că desfacerea moleculei a fost corect executată.

Din moment ce lanțurile polipeptidice s-au desprins din molecula anticorpilor prin ruperea punților disulfidice, se naște întrebarea în ce ordine sînt legate aceste patru lanțuri unul de celălalt. Este ușor de observat că sînt posibile cinci combinații: *HHLL*, *HLLH*, *LHHL*, *HLHL*, *LHLH*. Care din acestea este cea care corespunde

Scanned with OKEN Scanner

realității? Profesorul Porter de la St. Mary's Hospital din Londra a meditat îndelung asupra rezultatelor sale și a celor obținute de Edelman și în 1962 a ales combinația: *LHHL*.

Ea a fost desenată de Porter așa cum se vede în figura 4.

Din figură se observă că unirea celor două perechi de lanțuri polipeptidice în molecula anticorpilor se realizează prin intermediul a trei legături disulfidice. Poziția lor în molecula anticorpilor a putut fi determinată cu ajutorul unei enzime proteolitice, *papaina*, capabilă să „fractureze" lanțul polipeptidic. Astfel, din figura 4 se observă că papaina taie fiecare lanț H în două puncte și furnizează trei fragmente mari: două identice, compuse din lanțul L și capătul N-terminal al lanțului H. Ele s-au numit *Fab*, prescurtare de la cuvîntul englezesc *fragment antigen-binding* (fragment fixator de antigen), desemnînd capacitatea acestei bucăți din molecula anticorpilor de a lega antigenul. Celălalt fragment este alcătuit din cele două capete C-terminale ale lanțurilor H, unite între ele prin legături de hidrogen. Acest fragment este cunoscut sub numele de *Fc*, litera *c* subliniind proprietatea pe care o are acest fragment de a cristaliza. Alături de aceste fragmente mari, papaina desprinde din lanțul H și o peptidă mică, care cuprinde legătura disulfidică dintre cele două lanțuri și care s-a numit, pentru motive pe care le vom explica mai tîrziu, peptidă *balama*.

Supunînd acum reducerii cu mercaptoetanol fragmentul Fab, se obțin lanțuri L libere și capătul N-terminal al lanțului H care s-a notat cu

Scanned with OKEN Scanner

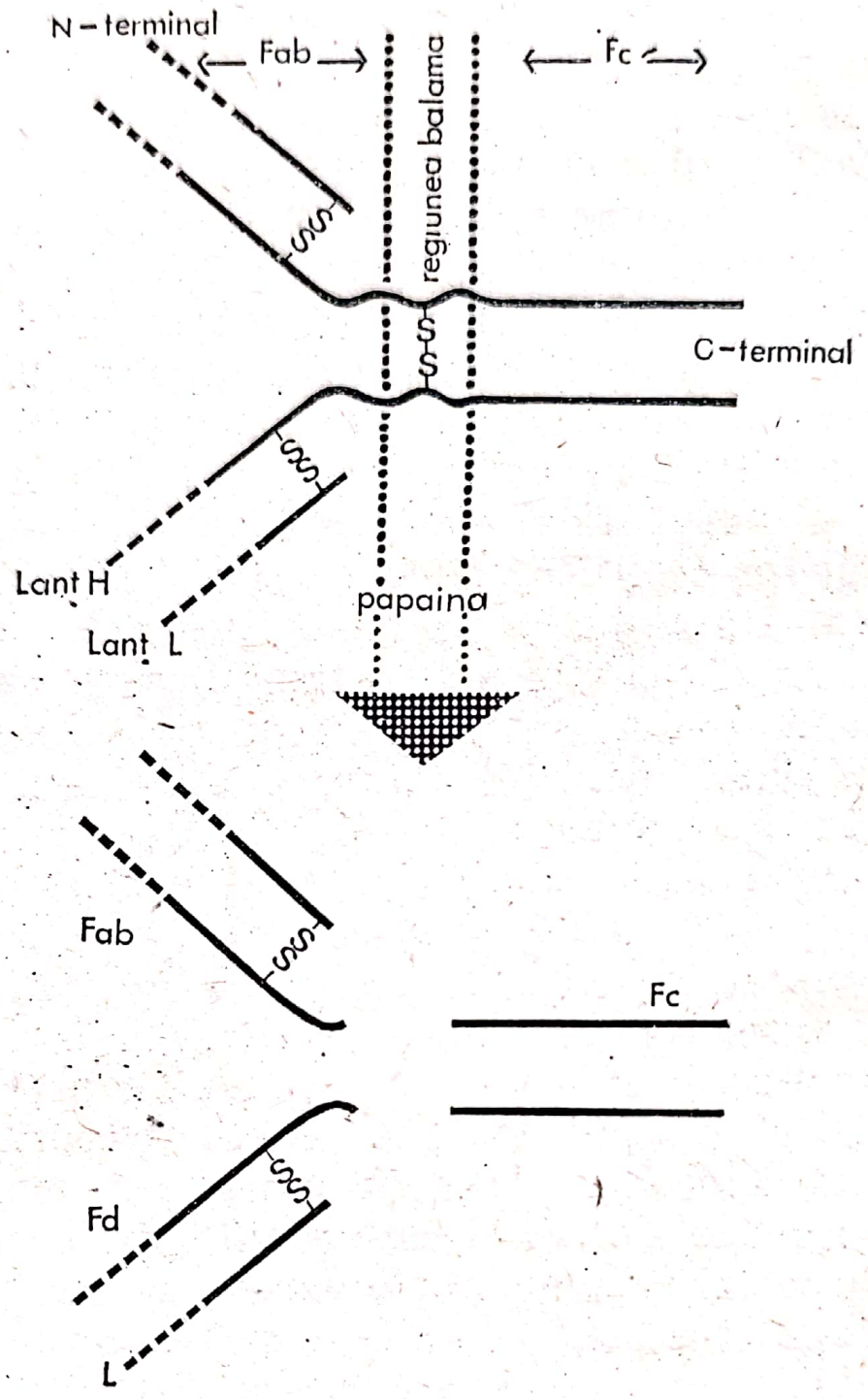


Fig. 4 — Structura anticorpilor de iepure desenată în planul hîrtiei

Liniile întrerupte figurează acele porţiuni din cele două lanţuri în care s-au înregistrat variaţii în secvenţa aminoacizilor. Porţiunea ondulată reprezintă regiunea „balama". Săgeata marchează punctele în care papaina atacă legăturile peptidice ale lanţului H. Configuraţia în Y este bazată pe constatarea că cele 2 fragmente Fab se pot îndepărta unul de altul în cursul reacţiei cu antigenul.

Scanned with OKEN Scanner

Fd (vezi figura 4). Litera *d* a fost aleasă numai pe considerentul că în alfabet ea urmează literei *c* și că, din pură întîmplare, celelalte fragmente din anticorp luaseră primele litere ale alfabetului.

După ce am rupt molecula anticorpilor și am intrat în posesia prețioaselor fragmente și lanțuri, să urmărim dacă nu cumva ele mai posedă și

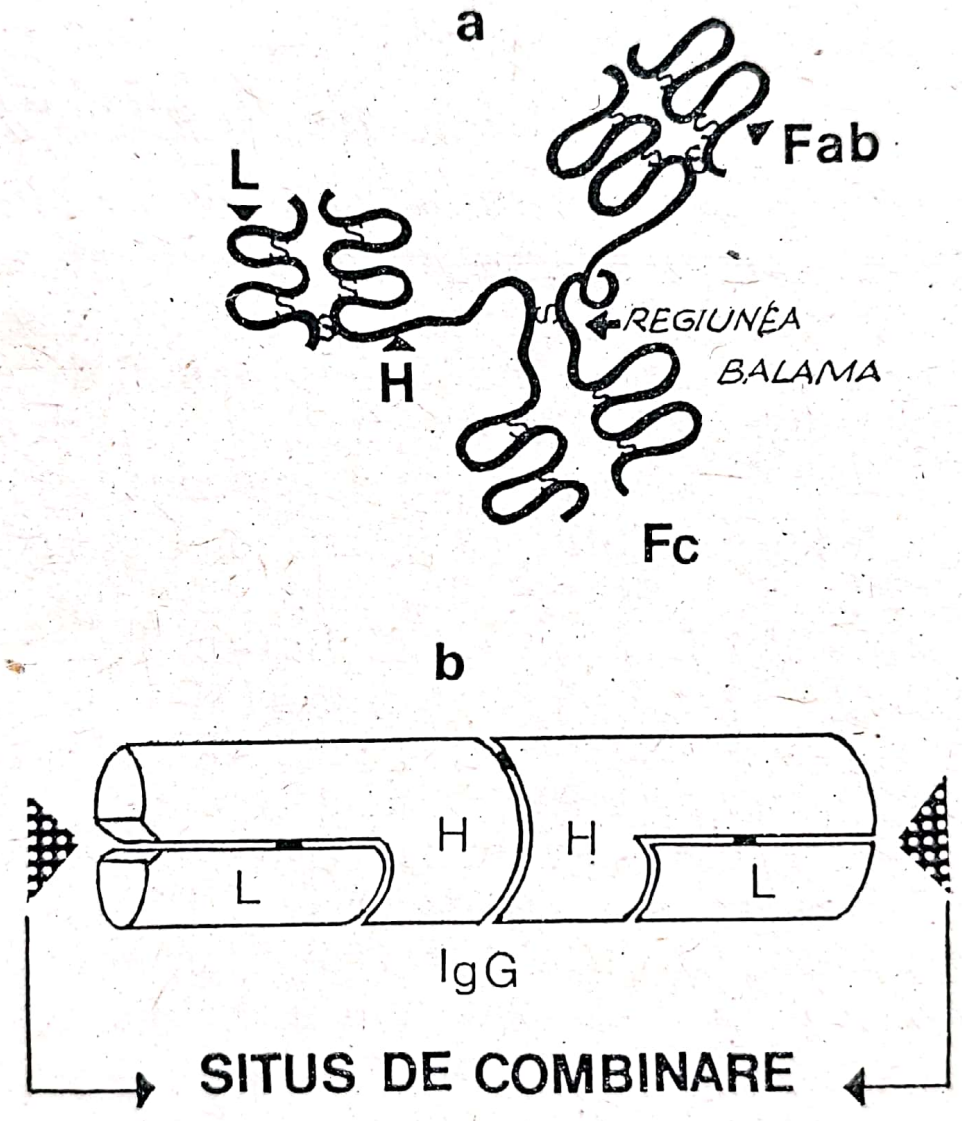


Fig. 5 — Structura detaliată a anticorpilor și așezarea lanțurilor în spațiu

a. Structura compactă a anticorpilor în care se figurează poziția legăturilor disulfidice inter- și intracatenare (notate cu simbolul S); *b.* modelul tridimensional al anticorpilor în care se figurează situsurile de combinare, la capetele lanțurilor H și L (modelul Edelman).

Scanned with OKEN Scanner

alte legături disulfidice în afara celor arătate mai sus. Cu reactivi speciali și cu multă răbdare vom ajunge la concluzia că lanțul L, ca și fragmentele Fd și Fc, au fiecare cîte două punți disulfidice în moleculă, ceea ce ne permite să facem acum un desen și mai detaliat al moleculei anticorpilor, și anume cel din figura 5.

Arhitectura anticorpilor

Oare am cîștigat ceva aflînd că molecula anticorpilor este „împănată" cu 12 legături disulfidice care se stabilesc în interiorul lanțului (legături intracatenare) și trei legături disulfidice care unesc cele 4 lanțuri (legături intercatenare)?

Dacă ne reamintim că în capitolul precedent am arătat că legăturile disulfidice care se stabilesc între cisteinele ce există într-un lanț polipeptidic determină plierea moleculei și îi conferă o configurație spațială caracteristică (structura terțiară a proteinelor), atunci prezența celor 12 legături disulfidice în lanțurile polipeptidice nu mai apare atît de inofensivă. Dimpotrivă, prezența lor dovedește că desenînd lanțurile polipeptidice H și L ca niște linii n-am făcut decît să schematizăm la extrem o situație care este în realitate mult mai complicată. Din cauza legăturilor disulfidice intracatenare, lanțurile sînt departe de a sta ca un fir de ață întins și sînt tot atît de întortocheate ca un ghem, așa cum rezultă și din figura 5.

Scanned with OKEN Scanner

Se observă că întreaga moleculă are aspectul unui ghem în care firul este cît de cît descurcat numai pe o mică porțiune în zona centrală, acolo unde se stabilește legătura disulfidică dintre cele două lanțuri H. Această porțiune conține peptida „balama" de care am vorbit mai sus. Deoarece extremitățile moleculei se pot mișca în jurul acestei părți, ea s-a numit și regiunea „balama" a moleculei care permite ca ea să se întindă sau să se strîngă, în funcție de felul în care se unește cu antigenul.

La unirea cu antigenul, anticorpul pune în joc numai anumite regiuni din molecula sa. Am arătat mai înainte că situsul de combinare a anticorpilor este găzduit de fragmentul Fab. Cîte situsuri de combinare se găsesc într-o moleculă de anticorp? La această întrebare putem răspunde pe loc, determinînd în precipitatul de ovalbumină-anticorp cîte molecule de antigen revin la o moleculă de anticorp. Găsim cifra 2. Această cifră dovedește că anticorpul are două situsuri de combinare. Cum un anticorp are două fragmente Fab, rezultă că fiecare dintre ele are cîte un situs.

Dacă ne imaginăm situsul de combinare ca o invaginație în molecula anticorpilor, cu o formă complementară grupării determinante a antigenului, se pune întrebarea: în care din cele două lanțuri, L ori H, se realizează acest mulaj? Experiențe izbutit conduse au arătat că ambele lanțuri participă la clădirea situsului de combinare. Lanțul L și fragmentul Fd prezintă spre capătul lor N-terminal o pliere deosebită a lanțurilor polipeptidice, care poate îmbrăca un

Scanned with OKEN Scanner

număr foarte mare de forme, astfel încît antigenul să se poată fixa în ele. Mărimea situsului de combinare în raport cu întreaga moleculă a anticorpilor este neînsemnată. El poate ocupa cel mult 5% din suprafața întregii molecule (10% pentru ambele situsuri). Știind că o moleculă de anticorp este constituită din peste 1 300 de aminoacizi, rezultă că un situs este format din plierea a cel mult 10—15 aminoacizi.

Examinînd complexele antigen-anticorp la microscopul electronic, s-a ajuns la concluzia că cele două situsuri de combinare se găsesc la capetele moleculei (vezi figura 5), ceea ce presupune un aranjament al celor două fragmente Fab la capetele moleculei. Înțelegem acum pe deplin rolul regiunii „balama" din molecula anticorpului: balamaua se deschide, fragmentele Fab se îndepărtează unul de celălalt și molecula ia forma unei țigări de foi ce poartă la ambele extremități situsul de combinare. În această situație și-a imaginat Edelman molecula de anticorp cînd a prezentat un model tridimensional care însumează toate cunoștințele pe care le-am înșirat mai sus. Modelul tridimensional al anticorpului permite înțelegerea faptului că lanțul L și cele două părți ale lanțului H (Fd și Fc) au o structură compactă datorită plierii catenei polipeptidice realizată de legăturile disulfidice intracatenare. Situsul de combinare este figurat sub forma unei „crevase" între cele două lanțuri și întreaga moleculă apare simetrică.

Scanned with OKEN Scanner

Structura primară a imunoglobulinelor

Cercetările privind secvența aminoacizilor în molecula anticorpilor n-au dat nici un rezultat deosebit pînă nu s-au pus la punct metodele de separare a celor două lanțuri polipeptidice care compun molecula. Abia după aceea s-au început lucrările de evidențiere a succesiunii aminoacizilor în fiecare lanț în parte.

Nu este de mirare că s-a început cu lanțul L, care are numai (!) 213—214 aminoacizi în molecula sa, lanțul H fiind de două ori mai voluminos (aproape 450 de aminoacizi). O astfel de muncă începe cu ruperea lanțului L în cîteva fragmente mai mici, realizată mai ales prin acțiunea tripsinei, izolarea fiecărui fragment și apoi determinarea în acestea a modului în care se succed aminoacizii. În final se asamblează secvențele parțiale și se stabilește secvența completă a lanțului. Această tehnică de lucru a fost aplicată mai întîi la determinarea secvenței în proteine cu greutate moleculară mică, cum ar fi insulina (51 de aminoacizi), apoi s-a extins la proteine cu greutate moleculară din ce în ce mai mare, ca lizozimul (129 de aminoacizi), mioglobina de cal (144 de aminoacizi) etc. Dacă proteina analizată era pură și alcătuită dintr-un singur lanț polipeptidic, experimentatorii nu au avut alte dificultăți decît acelea legate de natura delicată a analizei.

Scanned with OKEN Scanner

Desprinzînd din capătul N-terminal al unui lanț polipeptidic dat tot cîte un aminoacid, se constată că apar rînd pe rînd alți și alți aminoacizi, ordinea lor de apariție fiind cea a succesiunii lor în lanț:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

lys—glu—tre—ala—ala—lys—phe—glu—arg—ser—tre---

Scindarea ↓ I

aminoacid în poziția 1 *lys*+glu—tre—ala—ala—lys—phe—glu—arg—ser—tre---

Scindarea ↓ II

aminoacid în poziția 2 *glu*+tre—ala—ala—lys—phe—glu—arg—ser—tre---

Scindarea ↓ III

aminoacid în poziția 3 *tre*+ala—ala—lys—phe—glu—arg—ser—tre---

Fragment din capătul N-terminal al ribonucleazei

Scanned with OKEN Scanner

Nu s-a constat la nici una dintre proteinele a căror secvență se cunoaște pînă în prezent ca la ruperea unei legături peptidice marginale să apară, în loc de un singur aminoacid, doi sau mai mulți. De fapt, cînd un astfel de fenomen a fost semnalat, s-a constatat fie că proteina analizată nu era pură și mai conținea și alte proteine, fie că era formată din mai mult de un lanț polipeptidic. Este evident că pînă la îndepărtarea acestor cauze determinarea secvenței nu era posibilă.

Iată însă că acest fenomen nedorit și-a făcut apariția în laboratoarele celor ce porniseră la descifrarea secvenței lanțurilor L. Aici nu putea fi vorba de o impurificare a preparatelor și, lucru ciudat, apariția a doi sau mai mulți aminoacizi într-o singură poziție se semnala numai în jumătatea N-terminală a lanțului L, cealaltă jumătate comportîndu-se la fel ca orice proteină cunoscută pînă atunci. Deci lanțul L apărea a fi compus din două jumătăți distincte: una dinspre capătul C-terminal, avînd o secvență invariabilă a celor 106—107 aminoacizi ai săi, iar cealaltă care cuprinde primii 107—108 aminoacizi din partea N-terminală și care are o secvență variabilă ce nu permite să se determine o ordine unică a aminoacizilor. Astfel, lanțul L izolat din anumiți anticorpi de iepure a prezentat secvența alternativă la capătul N-terminal: 1. ala/ile; 2. val; 3. val/leu; 4. val; 5. glu/ala; 6. glu/ala etc.

Acest fapt sugera clar că lanțul L nu este compus dintr-o populație de molecule identice unele cu celelalte, ci dintr-un amestec de molecule care prezintă anumite trăsături comune

Scanned with OKEN Scanner

(secvență identică în partea invariabilă), dar și distincte (secvențe tipice în partea variabilă). N-a mai surprins apoi pe nimeni constatarea acestui fenomen și la nivelul lanțului H, și anume: jumătatea N-terminală din fragmentul Fd prezintă o secvență variabilă, în timp ce cealaltă parte din fragmentul Fd și întreg fragmentul Fc sînt alcătuiți din aminoacizi ordonați într-o secvență unică.

Constatările secvențialiștilor au adus aceste studii într-un punct mort. Aici s-ar fi împotmolit toată chestiunea dacă n-ar fi existat și bolile pe acest pămînt. Una dintre ele, numită *mielom*, se caracterizează prin apariția de tumori osoase multiple, anemie și paralizie. În sîngele acestor bolnavi se constată o creștere masivă a gamma-globulinelor, iar în urina lor se elimină o proteină numită, după descoperitorul ei, *Bence-Jones (B-J)*. Această proteină B-J nu este altceva decît lanțul L. Studiile de secvență a proteinei B-J începute în 1953 de imunochimistul american Putnam au condus la concluzia că bolnavii de mielom sintetizează numai un singur fel de gamma-globuline, din care cauză, fapt miraculos și dătător de speranță, lanțul lor L are o secvență unică și în partea sa N-terminală. Determinînd secvența la mai multe proteine B-J obținute de la diferiți bolnavi, Putnam a observat că secvența acestora era identică în partea sa C-terminală la toți bolnavii, dar că apăreau deosebiri de la bolnav la bolnav în partea N-terminală a lanțurilor L. Aceste experiențe au fost de fapt acelea care au arătat că din lanțul L primii 107—108 aminoacizi pot fi considerați ca alcătuind partea

Scanned with OKEN Scanner

variabilă, iar ultimii 106—107 partea invariabilă sau constantă. Din acest motiv, în figura 4 jumătățile variabile ale lanțurilor L și ale fragmentelor Fd s-au desenat printr-o linie punctată.

Comparînd secvențele proteinelor B-J de la mai mulți bolnavi, s-a observat că din cele 107—108 resturi de aminoacizi care compun partea variabilă a lanțului 30—40 de poziții conțin aminoacizi care diferă de la bolnav la bolnav.

În figura 6 s-au însemnat cu un semn distinctiv pozițiile aminoacizilor în lanțul L în care s-au semnalat diferențe la proteine B-J provenite de la 30 de bolnavi.

Nu trebuie să ne închipuim că fiecare bolnav are 30—40 de aminoacizi specifici care nu există în pozițiile respective la alți bolnavi, ci doar că la numărul total de cazuri studiate s-a observat că există aceste diferențe, desigur proteina B-J a unui bolnav putînd diferi de proteina B-J a altuia numai prin cîțiva aminoacizi. Rezultă deci că lanțurile L din gamma-globulina normală sînt eterogene și se comportă ca și cum ar fi un amestec de numeroase proteine de tip B-J provenite de la subiecți bolnavi de mielom.

Lanțurile H izolate din gamma-globuline mielomatoase de om prezintă la capătul lor N-terminal aceeași omogenitate ca proteinele B-J, de aceea ele se pretează de minune la studiile de secvență. Grație lor, în momentul de față cunoaștem secvența completă a unei gamma-globuline mielomatoase (Edelman, 1970).

Concluzia care se desprinde din aceste cercetări arată că anticorpii sînt excepții în lumea proteinelor. Dacă orice proteină pură prezintă

Scanned with OKEN Scanner

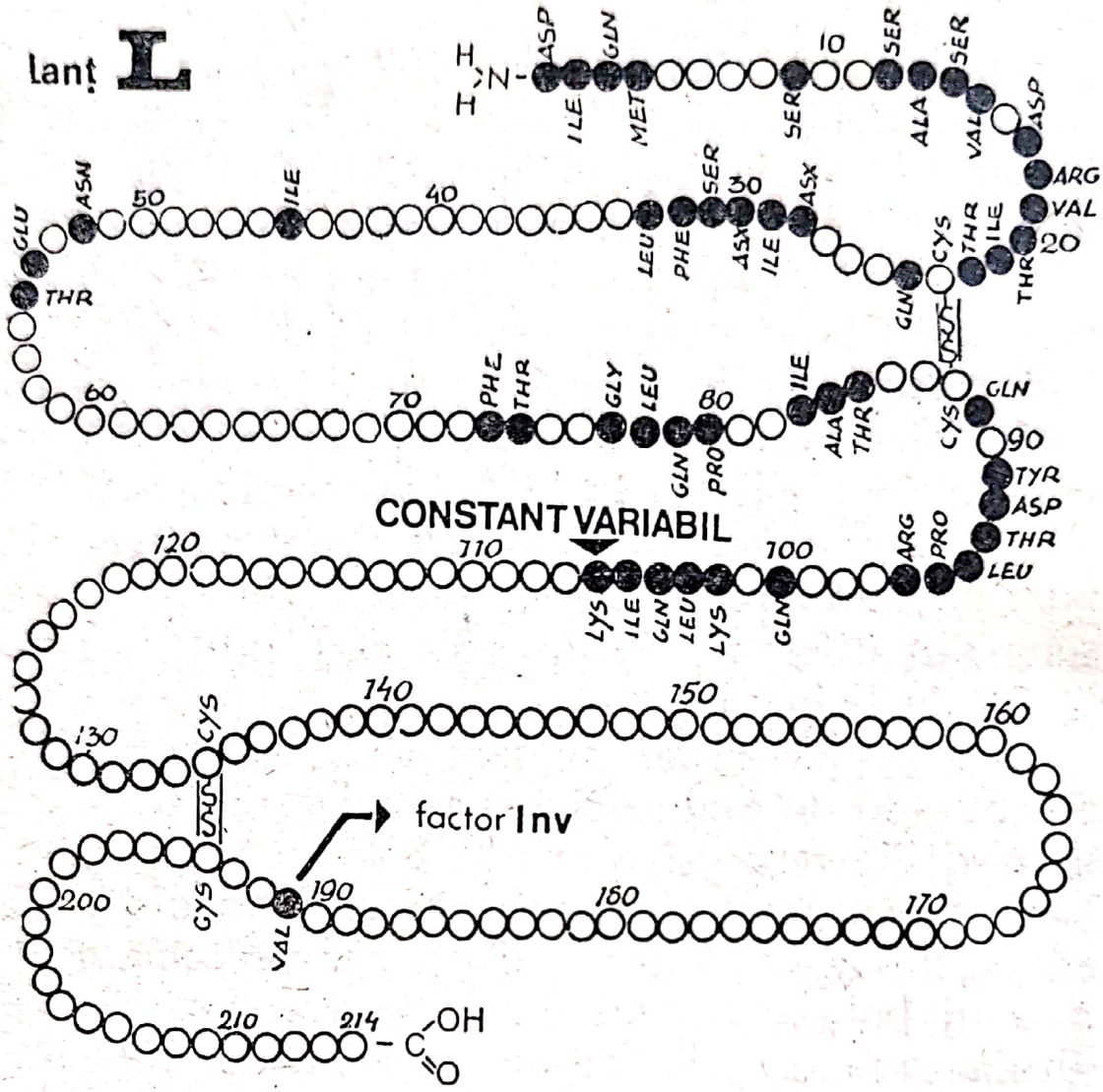


Fig. 6 — Secvența aminoacizilor în lanțul ușor (proteina Bence-Jones)

Cercurile înnegrite indică pozițiile care sînt ocupate de aminoacizi diferiți la proteine B—J obținute de la alți bolnavi. În poziția 191 există o variație legată de deosebirile genetice dintre bolnavi (alotipul Inv).

o secvență unică, demonstrînd că din miliardele de molecule ce compun preparatul analizat toate sînt identice, preparatele de anticorpi, chiar în cea mai purificată stare, sînt constituite doar din populații de molecule asemănătoare între care există deosebiri de structură primară la nivelul unor regiuni din lanțurile lor polipeptidice. Numai datorită acestei excepții organismul vertebratelor este capabil să elaboreze o replică proteică fidelă

Scanned with OKEN Scanner

(anticorpii), capabilă să anihileze orice agent străin pătruns în mediul său intern. Semnalarea acestei comportări excepționale a însemnat un pas hotărîtor pentru înțelegerea modului în care se formează anticorpii în organism (vezi capitolul 9).

Dacă configurația situsurilor de combinare este determinată de secvența unor aminoacizi în molecula anticorpilor, așa cum se consideră în prezent, rămîne să se stabilească care sînt pozițiile din lanțul H și din lanțul L în care aminoacizii se modifică de la anticorp la anticorp, în funcție de specificitatea acestora. Răspunsul la această întrebare ar permite să se stabilească legătura dintre structura anticorpilor și activitatea lor imunologică specifică și astfel să se înțeleagă întreg mecanismul reacțiilor imune. Trebuie să spunem că sîntem departe de împlinirea acestui deziderat, deoarece aceste corelații structură-activitate cer să se cunoască cît mai multe secvențe de anticorpi cu specificitate determinată. Or, pînă în prezent nu se cunoaște decît structura unor subunități de gamma-globuline fără activitate imunologică. Mai este încă mult drum de străbătut pînă se vor putea obține anticorpi care să nu prezinte fenomenul indezirabil al variației secvenței și a căror structură să poată fi deci determinată.

Scanned with OKEN Scanner

4

În care se prezintă lista anticorpilor înscriși să candideze la apărarea organismului și se face o scurtă caracterizare a activității lor

În capitolul precedent am arătat că anticorpii aparțin marii familii a gamma-globulinelor sau imunoglobulinelor. Să cunoaștem mai îndeaproape pe membrii acestei familii:

Primul și cel mai bogat este *imunoglobulina G (IgG)*. Ea reprezintă aproximativ 75% din toate imunoglobulinele serului. Are o greutate moleculară de 150 000 și cea mai mică viteză de migrare electroforetică. Este cea mai studiată dintre toate imunoglobulinele, fiind vedeta tuturor premierelor imunochimice. Anticorpii care aparţin acestei clase au două situsuri de combinare în molecula lor.

Al doilea membru este *imunoglobulina M (IgM)*. Despre ea s-a spus în introducere că are o greutate moleculară mare, simbolul *M* prescurtînd cuvîntul grecesc *macros*, care înseamnă mare. Greutatea moleculară a acestei proteine

Scanned with OKEN Scanner

este de 900 000. Reprezintă aproximativ 8% din toate imunoglobulinele serului. Are o viteză de migrare electroforetică mai mare decît IgG; anticorpii de tip IgM posedă 10 situsuri de combinare în moleculă.

Al treilea membru este *imunoglobulina A (IgA)*. Ea are o greutate moleculară care oscilează în jurul cifrei de 300 000 și este cea mai rapidă dintre imunoglobuline la „întrecerea" electroforetică. Reprezintă aproximativ 15% din imunoglobulinele serice. Anticorpii de tip IgA posedă două sau uneori numai un singur situs de combinare în molecula lor.

Familia imunoglobulinelor are și membri mai neînsemnați (cantitativ nu calitativ!), care au abia 3% din toate voturile familiei. Ei sînt reprezentați prin *imunoglobulinele D și E (IgD și IgE)*, descoperite numai de cîțiva ani în serul uman și de aceea mai puțin cunoscute. Există indici că aceste rude sărace (în special IgE) sînt mai importante decît o arată cantitatea în care se găsesc în ser și joacă un rol însemnat la apărarea locală a mucoaselor care căptușesc căile respiratorii, ochii, tubul digestiv și sistemul genito-urinar.

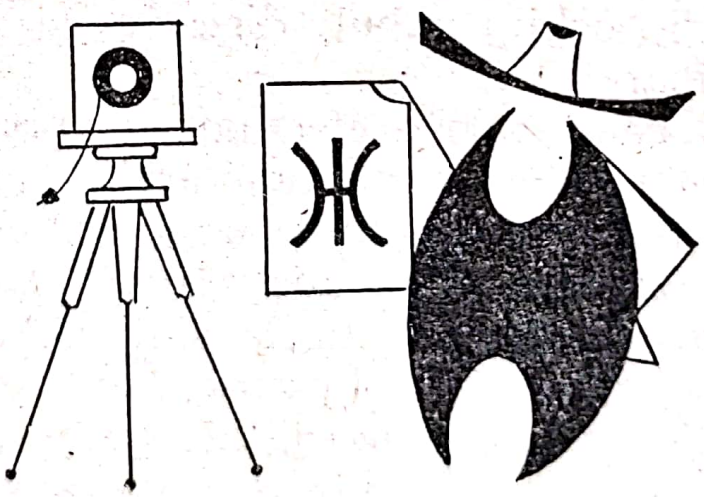
Studii comparative efectuate asupra tuturor membrilor acestei familii au arătat că se pot evidenția importante asemănări și deosebiri între ei. Să enumerăm și să analizăm cîteva:

1. Toate imunoglobulinele sînt alcătuite din perechi de lanțuri grele și ușoare. Lanțurile ușoare sînt *identice* la toate tipurile de imunoglobuline, pe cînd lanțurile grele au o secvență caracteristică pentru fiecare imunoglobulină. Pentru a se deo-

Scanned with OKEN Scanner

sebi unele de altele, lanțurile grele ale imunoglobulinelor s-au notat cu litere grecești corespunzătoare simbolului pe care îl poartă. Lanț γ (pentru IgG), lanț μ (pentru IgM), lanț α (pentru IgA) etc. Deosebirea dintre lanțurile grele ale imunoglobulinelor constă în numărul și secvența aminoacizilor care le compun.

2. Deosebirea dintre IgG și IgM este determinată nu numai de faptul că ele au lanțuri grele distincte, ci și de numărul de perechi de lanțuri din molecula lor. Astfel s-a dovedit că IgM este constituit din cinci subunități asemănătoare cu IgG. Subunitățile sînt legate una de cealaltă prin intermediul unor punți disulfidice care se stabilesc între resturile de cisteină plasate la coada C-terminală a lanțurilor μ, așa cum se vede în figura 7 a. Am așezat alături o fotografie a IgM scoasă la microscopul electronic și litera rusească Ж, pentru a justifica acest aranjament al celor cinci subunități de IgM pe care „fotograful" le reclama a fi așezate într-un fel care amintește această literă rusească.



Portretul „la minut" al unei imunoglobuline

Scanned with OKEN Scanner

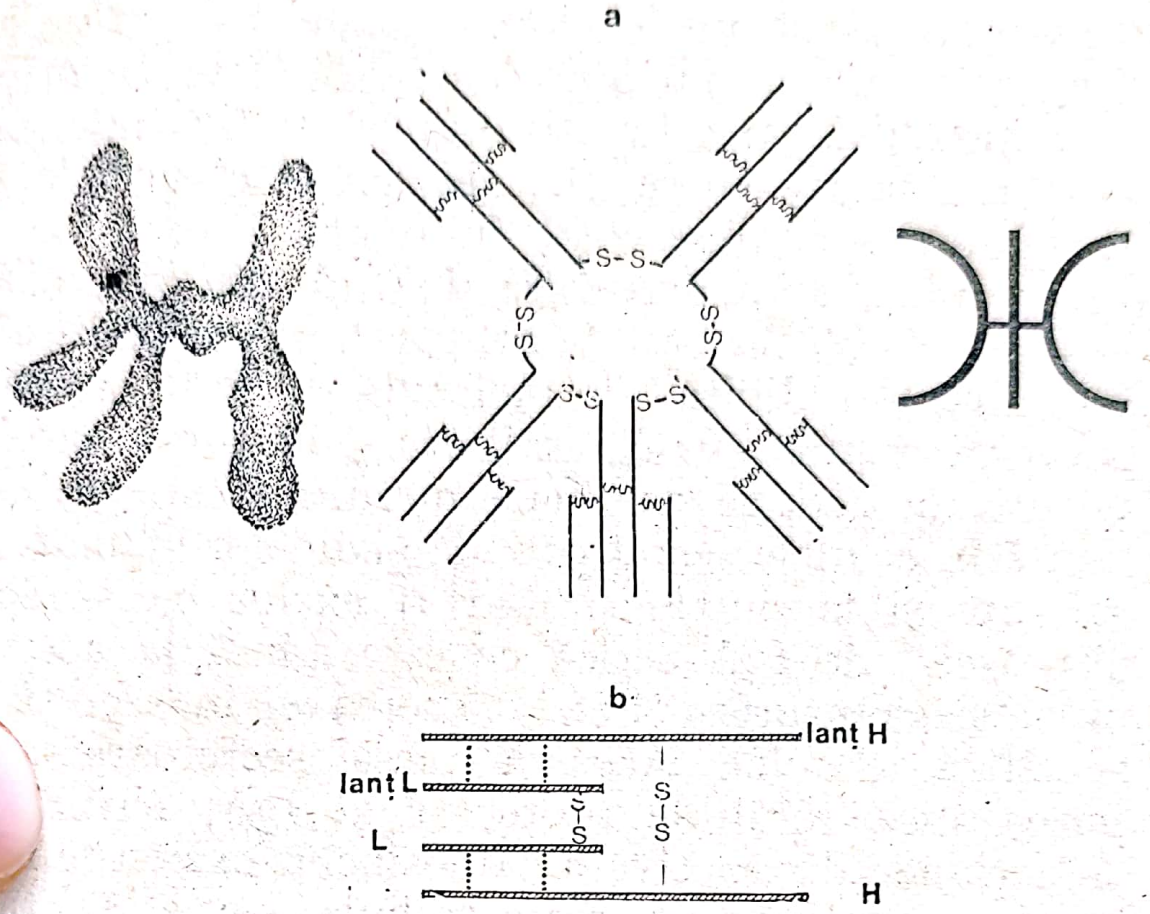


Fig. 7 — Structura schematică a IgM și a unei IgA speciale

a. IgM. De la stînga la dreapta se prezintă un desen după o fotografie la microscopul electronic, apoi o schemă a moleculei în care se observă legarea celor 5 subunităţi prin punţi disulfidice aşezate la capătul C-terminal al lanţului greu şi litera rusească ж (j) a cărei formă aminteşte de structura IgM;

b. IgA. Un tip de moleculă care se abate de la regula generală de legare a lanţurilor (cu puncte s-au însemnat legăturile de hidrogen care ţin unite cele două perechi de lanţuri una de cealaltă). Molecula conţine un singur situs de combinare.

3. Caracterizarea IgA în comparație cu companionii săi principali este mai complicată, datorită faptului că IgA își permite capriciul de a fi diferit de la animal la animal. Astfel, există animale (calul și vaca) la care IgA pare a fi construit din unirea a două subunități asemănătoare cu IgG. La om IgA pare a fi construit ca și IgG, numai că la această specie există pe lîngă un

Scanned with OKEN Scanner

IgA normal și un exemplar cam excentric la care lanțurile L nu sînt legate de cele H prin intermediul legăturilor disulfidice tradiționale, ci sînt încătușate între ele, de aceea cineva le-a desenat așa cum se vede în figura 7 b.

În plus, spre deosebire de IgA din ser, cea care se găsește în laptele colostral, salivă, lacrimi etc., mai are „lipită" de molecula sa încă o piesă proteică numită *piesă secretoare* și despre a cărei natură nu prea se știe mare lucru. Ea este sintetizată în celulele secretoare ale glandelor mamare, salivare și lacrimale și n-ar fi exclus ca să se „lipească" de IgA serică ce este adusă la acest nivel și să ușureze astfel trecerea ei în secreția specifică glandei. Această piesă secretoare ar putea juca rolul de protector al IgA, ferind-o de acțiunea distructivă a catepsinelor existente în bariera celulară pe care trebuie s-o străbată această proteină pentru a ajunge în secreție.

4. La injectarea unui animal cu un antigen oarecare (de exemplu ovalbumina) se constată că după prima injecție apar în sînge anticorpi de tip IgM și numai după repetarea injecției, alături de anticorpii IgM, își fac apariția și cei IgG. Continuînd să ciuruim animalul cu injecții, vom constata că producția anticorpilor IgM încetează, fabrica de anticorpi profilîndu-se numai pentru sinteză de anticorpi IgG. Această comportare a fost schematizată în graficul din figura 8.

Pe bună dreptate anticorpii IgM s-au numit „timpurii" și cei IgG „tîrzii". Este de notat că binecunoscuta sentință „ontogenia repetă filogenia" se aplică și aici: animalele tinere răspund la introducerea unui antigen prin formarea preferen-

Scanned with OKEN Scanner

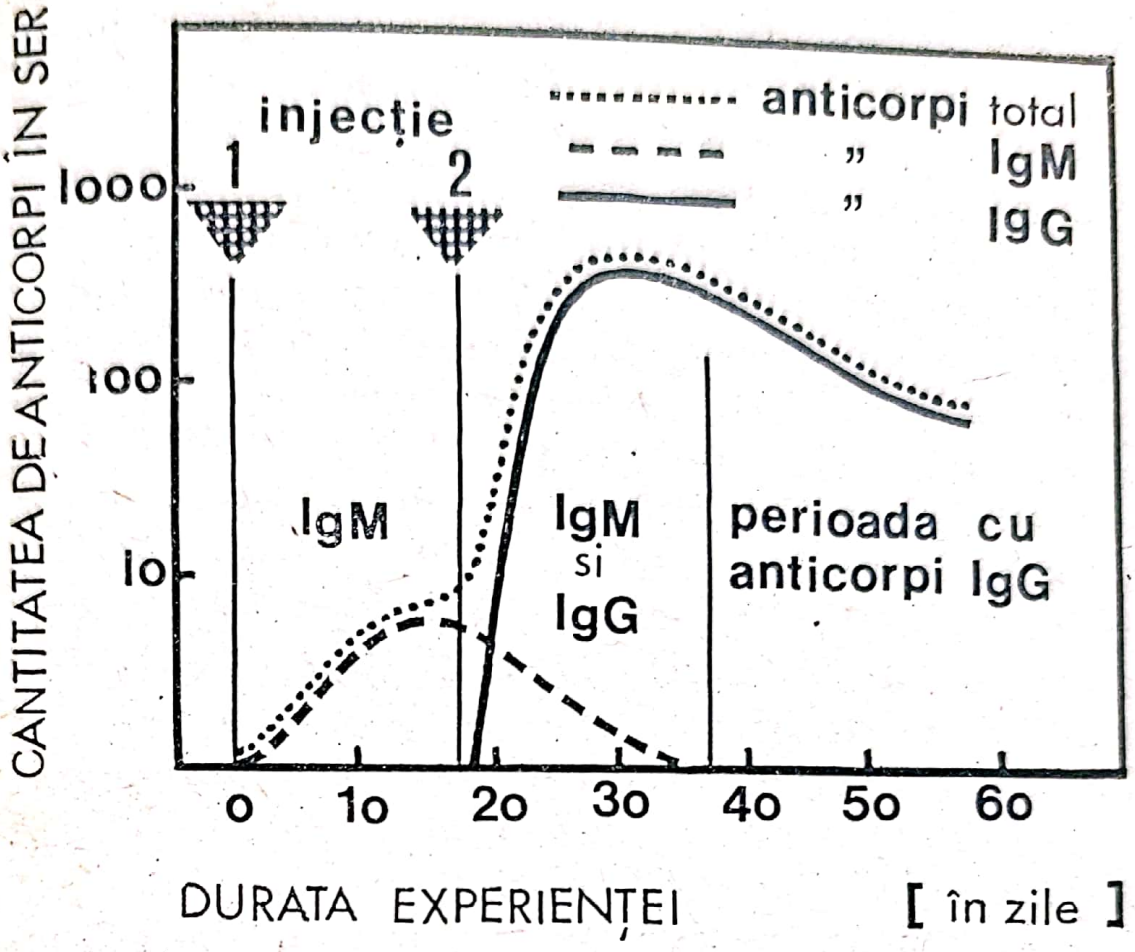


Fig. 8 — Apariția anticorpilor de tip IgG și IgM în cursul imunizării

țială a anticorpilor de tip IgM; există vertebrate primitive (o specie de rechini) care nu sînt capabile să fabrice decît anticorpi de tip IgM și, în sfîrșit, repetăm, în cursul imunizării unui animal adult întîi apar anticorpii IgM și apoi cei IgG.

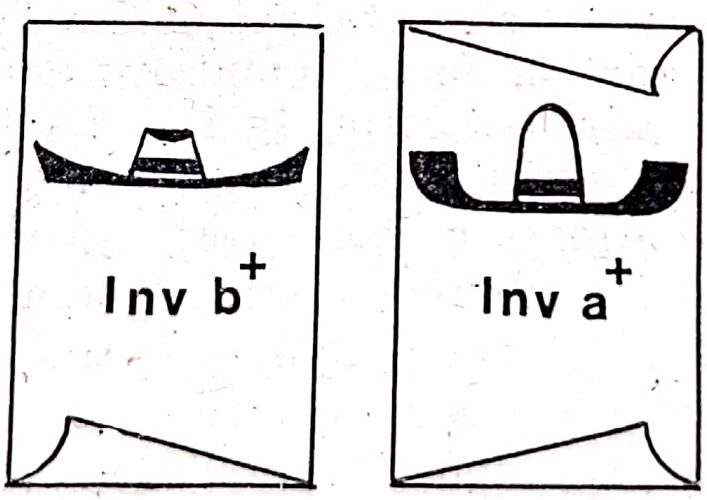
5. Imunoglobulinele nu sînt proteine... curate. Ele mai conțin și o mică cantitate de glucide (carbohidrați) care reprezintă 3% din molecula IgG și 10% din cea a IgM și IgA. Este vorba de două glucide distincte care se ancorează de două resturi de aminoacizi, unul plasat în regiunea „balama" și altul în fragmentul Fc.

Scanned with OKEN Scanner

6. Așa cum oamenii se împart în patru grupe sanguine principale: *A*, *B*, *AB* și *O*, după cum pe eritrocitele lor se găsesc anumite substanțe de natură glucidică specială, tot așa ei pot fi împărțiți în mai multe grupe după cum în molecula imunoglobulinelor lor se găsesc anumiți aminoacizi specifici. Acești aminoacizi specifici se pot găsi localizați atît pe lanțul ușor cît și pe cel greu. Astfel s-a stabilit că:

— Oamenii se împart în două grupe, după cum în lanțul L există în poziția 191 aminoacidul valină *(Inv a⁺)* sau leucină *(Inv b⁺)*. Deci există oameni care aparțin de grupul Inv a^+ sau de cel Inv b^+, după structura lanțului L. Este suficient ca din cei 213—214 aminoacizi numai *unul* să fie înlocuit de altul, ca doi oameni să fie deja... diferiți (vezi fig. 6).

— Oamenii se împart în mai multe grupe, după cum în lanțul lor γ există unul sau mai mulți aminoacizi diferiți; unii localizați în fragmentul Fd, ceilalți în fragmentul Fc. Aceste grupe au fost desemnate sub simbolul *Gm*. În momentul de față nu se cunosc exact aminoacizii care se



La care alotip aparțineți?

Scanned with OKEN Scanner

deosebesc de la un grup la altul, dar aflarea lor este numai o chestiune de timp.

Aceste forme structurale diferite ale imunoglobulinelor au primit numele de *alotipi*[1], de la cuvintele grecești *allos* = altul și *typos* = caracter. Deoarece un om aparține la o anumită grupă Gm și Inv, după cum imunoglobulinele sale au o structură primară dată și deoarece acest caracter se transmite urmașilor prin legi mendeliene, este clar că urmărirea acestor factori genetici se aplică, ca și grupele sanguine, în expertiza de paternitate. Astfel s-a arătat că un copil care aparține de grupul $Gm(a^+)$ trebuie să aibă cel puțin unul dintre părinți $Gm(a^+)$ și că din doi părinți $Gm(a^-)$ nu se pot naște decît copii $Gm(a^-)$.

Existența claselor de imunoglobuline și a diferențelor alotipice în sînul fiecărei clase arată că pentru cunoașterea unui anticorp trebuie să răspundem cel puțin la două întrebări: din ce clasă face parte el și care este alotipul de care aparține? Abia după ce am răspuns corect la aceaste întrebări, putem pune întrebarea capitală: cum poate avea anticorpul situsuri de combinare care să recunoască numai grupările determinante ale antigenului care i-a dat naștere? Fără aceste fișe de

---

[1] Creatorul acestui cuvînt este imunologul francez Oudin, care a observat că iepurii (deci nu numai oamenii!) au tipuri distincte de gamma-globuline, care pot fi recunoscute ca atare în urma unor reacții imunochimice specifice. Iepurii se împart în 6 grupe distincte pe criteriul deosebirilor dintre alotipuri, trei din aceste grupe fiind determinate de factori localizați pe lanțul L, iar celelalte grupe de factori de pe lanțul H.

Scanned with OKEN Scanner

caracterizare prealabilă a anticorpilor, pe care le-am prezentat mai sus, riscăm să punem pe socoteala situsurilor de combinare diferențe de structură chimică care sînt cauzate de fapt de apartenența lor la una din cele două clase sau la unul din cei doi alotipi diferiți, și astfel să trecem pe lîngă adevăr.

Pentru a înțelege însă felul în care antigenul provoacă fabricarea anticorpilor specifici, este imperios necesar să cunoaștem mai multe despre antigen, ceea ce își propune de altfel capitolul ce urmează.

Scanned with OKEN Scanner

5

În care se prezintă tot felul de antigene și se discută despre însușirea lor de a da naștere anticorpilor

Antigenele sînt o noțiune atît de biologică încît descumpănește pe orice chimist care vrea să știe ce compuși chimici pot fi numiți astfel. Se constată că pot da naștere la anticorpi, dacă sînt injectate în organismul unui animal vertebrat, o sumedenie de componente care aparțin de trei din cele patru grupe clasice de substanțe plastice: *proteine*, *glucide* (zaharuri) și *acizi nucleici*. Doar *lipidele* (grăsimile) nu par a fi apte a da naștere anticorpilor, ușurînd astfel munca chimistului doritor să discearnă generalul de particular.

Lucrurile se complică și mai mult dacă luăm în considerare acele fapte care au introdus noțiunea de *haptenă*. Dar să începem cu... începutul.

„Paul Ehrlich citea grămezi de cărți și articole și găsea în ele mai mult decît gîndiseră autorii lor.

Scanned with OKEN Scanner

Într-o zi ședea pe unicul scaun pe care nu se găsea un munte de cărți și răsfoia toate revistele de chimie cu rîvna și speranța unui alchimist care caută formula pentru piatra filozofală. Și a dat peste un medicament deosebit de primejdios. Avea numele inofensiv de *atoxil*, adică neotrăvitor... Atoxil-ul consta dintr-un nucleu benzenic, adică din șase atomi de carbon care fug unul după altul, ca un cîine care vrea să-și prindă coada, și din patru atomi de hidrogen, puțin amoniac și oxid de arsen, despre care oricine știe că e otrăvitor. Să-l modificăm puțin, zise Paul Ehrlich...“

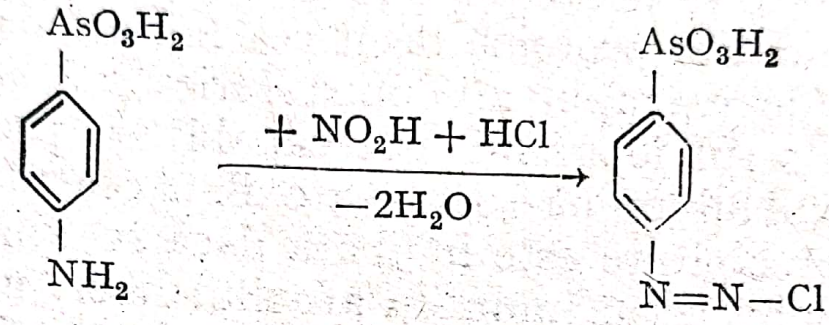
Trebuie să ne oprim aici cu citatul scos din cartea lui Paul de Kruif, *Vînătorii de microbi*. Ne oprim, fiindcă scopul nostru nu este de a urmări cum a ajuns Ehrlich să prepare acel miraculos *salvarsan* contra sifilisului pornind de la atoxil.

Tot de la atoxil a pornit și Landsteiner, dar drumul său nu a dus la nici o descoperire senzațională care să tulbure opinia publică; Landsteiner a făcut mai mult decît atît. Cu lucrările sale a fundamentat noțiunea de *specificitate antigenică* pe care se sprijină toată imunologia și imunochimia modernă. Truda sa, întinsă pe perioada dintre cele două războaie mondiale, nu a provocat nici măcar interesul tuturor imunologilor, fiindcă receptivitatea la idei abstracte se pare că nu este apanajul contemporanilor. Iar astăzi, cînd nu poți deschide un jurnal fără a citi ceva despre transplantările de organe, cînd arma imunologică se ridică spre cancer, cînd se demonstrează că boli a căror origine era tot atît de necunoscută ca și cea a universului sînt produse prin mecanisme imunologice, oare cine mai vede umbra

Scanned with OKEN Scanner

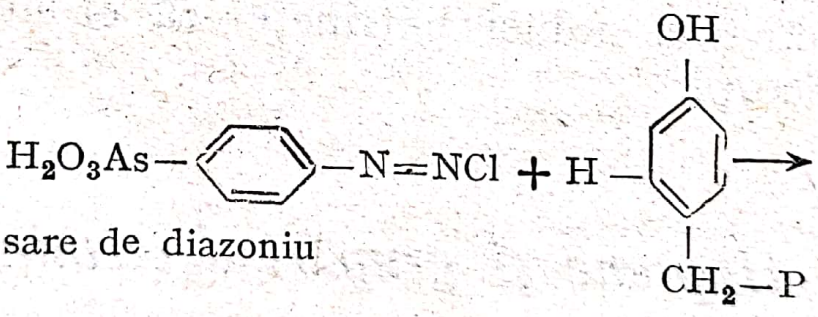
lui Landsteiner profilîndu-se în spatele lor? Un biet om de știință care s-a ocupat cu o chestiune atît de aridă (și greu de înțeles) ca specificitatea antigenică!

Dar să ne reîntoarcem la atoxil și cu această ocazie să-l scriem și să arătăm cum l-a „modificat puțin" Landsteiner:

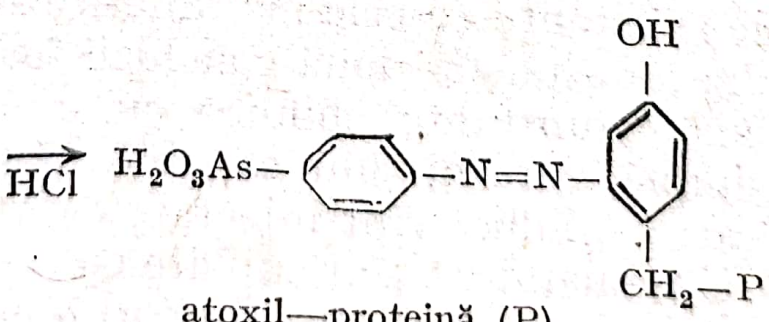


atoxil — sare de diazoniu

Această operație chimiștii o numesc diazotare. Ea dă naștere la un compus care se numește sare de diazoniu și care este capabilă să se lege de proteine prin intermediul tirozinei:



sare de diazoniu — rest tyr în proteină (P)



atoxil—proteină (P)

Injectînd repetat acest *atoxil-proteină* unui iepure se constată că după scurgerea timpului „reglementar" animalul a produs două feluri de anticorpi: unii capabili să se combine cu proteina folosită ca suport (de exemplu ovalbumina) și alții capabili să fixeze atoxilul. Această ultimă comportare se poate pune în evidență legînd atoxilul de o altă proteină decît cea folosită la imunizare (de exemplu albumină serică) și constatînd că serul iepurelui este capabil să precipite complexul albumină serică—atoxil. Această reacție de precipitare este inhibată dacă se amestecă în prealabil serul imun cu atoxilul liber, nelegat de proteină, dovadă că situsurile de combinare ale anticorpilor fixează atoxilul; fiind astfel blocate, nu se mai pot combina cu atoxilul legat de albumina serică și deci reacția de precipitare nu mai are loc. Trebuie spus că administrînd atoxil nelegat de proteină iepurilor putem să le facem injecții pînă la adînci bătrînețe, că ei nu vor face anticorpi.

Haptene și grupări determinante

Extinzînd această metodă simplă de cercetare la zeci de substanțe cu cele mai diferite structuri, Landsteiner a ajuns la două concluzii însemnate:

a. Există substanțe chimice cu o structură relativ simplă, care nu sînt capabile să dea naștere la anticorpi dacă sînt injectate ca atare animalelor, ci numai dacă sînt cuplate cu o proteină. Ele pot reacționa însă cu anticorpii care s-au

Scanned with OKEN Scanner

format față de produsul de cuplare. Aceste substanțe au fost numite *haptene* (de la cuvîntul grecesc *haptein* = a atașa).

b. Specificitatea unui antigen nu este determinată de întreaga moleculă, ci numai de o neînsemnată parte a ei, și anume de acea substanță chimică care a fost introdusă artificial în această moleculă. Această concluzie a fost extinsă asupra tuturor antigenelor naturale de natură proteică și polizaharidică, considerîndu-se că specificitatea lor nu este determinată de întreaga moleculă ci numai de o parte a ei, care s-a numit *grupare determinantă*. A rămas clasică în analele imunochimiei experiența lui Landsteiner din 1942, în care s-a arătat că prin hidroliza fibroinei din mătase (greutate moleculară 200 000) se obțin peptide cu greutate moleculară de 600—1 000, care inhibă reacția dintre fibroină și serul obținut prin imunizarea iepurilor cu fibroină. Aceste peptide, în a căror compoziție intră 10—12 aminoacizi, alcătuiesc deci grupările determinante ale fibroinei. Este interesant de arătat că experiențele lui Landsteiner au fost reluate de americanul Cebra în 1961, care a putut dovedi că gruparea determinantă a fibroinei conține lanțuri glicil-alanină cu cîteva resturi de tirozină.

Dacă specificitatea antigenelor este dată de grupările lor determinante, rezultă că două antigene sînt identice cînd grupările lor determinante sînt identice; restul moleculei poate fi complet diferit. Invers, două antigene sînt diferite atunci cînd grupările lor determinante sînt diferite, ceea ce nu exclude posibilitatea ca antigenele să pre-

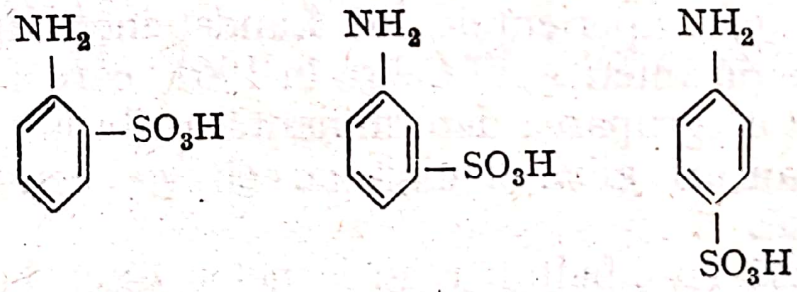
Scanned with OKEN Scanner

zinte identitate în restul moleculei, care, nefuncționînd ca grupare determinantă, nu este pusă în evidență prin reacțiile imunochimice corespunzătoare.

Gradul de specificitate al reacțiilor imunochimice este surprinzător de mare. Cîteva exemple luate la întîmplare ne arată că anticorpii pot să diferențieze grupările chimice între ele, poziția acestora în nucleul benzenic și configurații spațiale diferite.

Astfel, anticorpii au putut diferenția gruparea sulfonică (SO_3H) de cea arsonică (AsO_3H_2) sau carboxilică (COOH), nu însă și gruparea clor (Cl) față de metil (CH_3).

Poziția substituenților în nucleul aromatic este decisivă pentru specificitatea antigenelor artificiale rezultate. Astfel s-a demonstrat că cele trei forme izomere ale acizilor orto-, meta- și para-aminofenil-sulfonici pot fi diferențiate unele de celelalte cu ajutorul serurilor imune corespunzătoare:

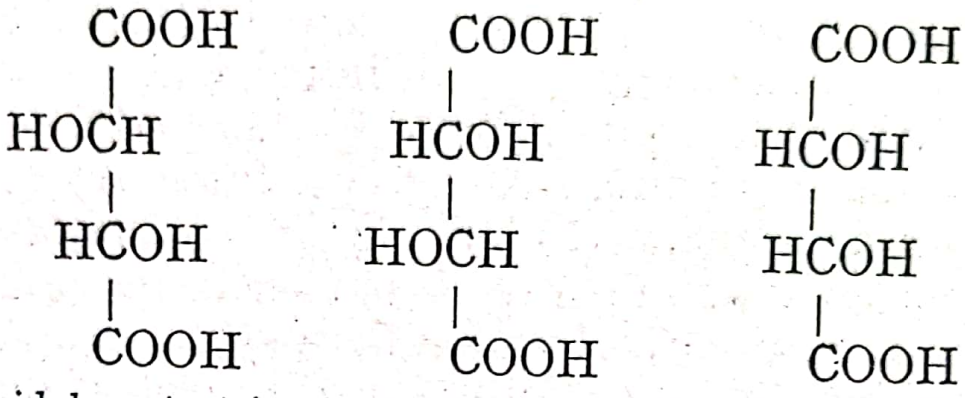


orto meta para

Influența configurației spațiale a grupării determinante asupra specificității a fost demonstrată cu ajutorul unor seruri imune capabile să diferențieze izomerii acidului tartric, care se deose-

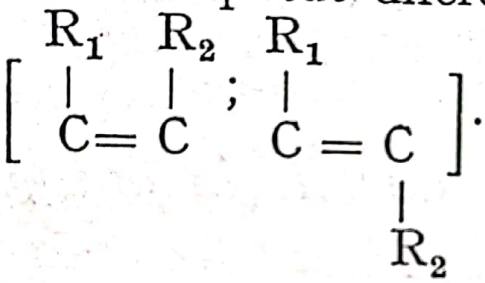
Scanned with OKEN Scanner

besc între ei numai prin poziția spațială a grupărilor H și OH:



Acid levo-tartric Acid dextro-tartric Acid mezo-tartric

În mod similar, cu ajutorul anticorpilor specifici s-au putut diferenția izomerii *cis* de cei *trans*



Aceste rezultate arată că anticorpii sînt apți să prezinte în raport cu antigenul care le-a dat naștere o extraordinară specificitate, capabilă să discearnă diferențe mici în forma și poziția grupării determinante. Aceste discriminări subtile între determinanții antigenici nu pot fi făcute decît în cazul în care variațiile chimice afectează forma, rigiditatea și sarcina lor electrică. Anticorpii nu pot însă să deosebească lanțuri de hidrocarburi alifatice ($-(CH_2)_n-$) cu o lungime variabilă, nu fac distincție între ciclurile benzen, ciclohexan, tiofen, naftalen și antracen. Această „incapacitate" a anticorpilor de a sesiza unele detalii apare paradoxală chimistului, care se miră cum se poate ca o deosebire atît de mică, cum ar fi un hidroxil așezat într-o parte sau alta a

Scanned with OKEN Scanner

atomului de carbon, să fie oglindită în sistemul de anticorpi, pe cînd deosebiri de structură și reactivitate chimică „uriașe", cum ar fi cea dintre benzen și ciclohexan, să nu impresioneze specific formarea anticorpilor. Această nedumerire se risipește dacă admitem că specificitatea imunochimică a antigenelor depinde de *forma* și *rigiditatea* grupărilor determinante și mai puțin de reactivitatea lor chimică. *Așezarea în spațiu* a grupărilor determinante este decisivă pentru ca antigenul să-și poată exercita pe deplin acțiunea sa; este mai important modul în care este așezată în spațiu gruparea decît natura ei chimică.

Constelația antigenică

Cîte grupări determinante cuprinde un antigen în molecula sa? La această întrebare putem da un răspuns numai pe jumătate satisfăcător, și anume că un antigen trebuie să aibă *cel puțin* două grupări determinante. Acest număr minim a fost dedus din teoria precipitării antigenului cu anticorpul. Ea presupune că pentru formarea rețelei din precipitat, dat fiind că anticorpul este bivalent, antigenul trebuie să aibă cel puțin două grupări determinante pe suprafața sa (vezi capitolul 10).

Numărul total de grupări determinante dintr-o moleculă variază de la proteină la proteină, fiind cu atît mai mare cu cît dimensiunile moleculei sînt mai mari. Astfel, ribonucleaza (greutate moleculară /GM/ = 15 000) are 3 grupări,

Scanned with OKEN Scanner

ovalbumina (GM = 45 000) are 5 grupări, iar toxina difterică (GM = 75 000) are 8 grupări. Numărul grupărilor determinante prezente în molecula unui antigen se numește *valența antigenului*. Ea se află determinînd cîte molecule de anticorpi revin la o moleculă de antigen într-un precipitat imun. Trebuie să reținem însă că numărul de anticorpi care se fixează pe o moleculă de antigen este *mai mic* decît numărul real de grupări determinante, deoarece în cursul combinării antigenului cu anticorpul anumite grupări determinante pot fi „împiedicate" să participe la reacție din cauza unor configurații spațiale particulare.

O problemă importantă este aceea dacă toate grupările determinante de pe un antigen sînt identice sau diferite. Răspunsul este categoric: pe suprafața unui antigen există mai multe feluri de grupări determinante. Primul exemplu a fost dat de *toxina tetanică*. Datorită toxicității sale, ea nu poate fi injectată animalelor fără pericolul grav de a le omorî. Producerea anticorpilor poate fi totuși realizată, injectînd toxina tratată în prealabil cu *formaldehidă*. Acest tratament blochează anumite grupări aminice libere ale proteinei și îi anulează toxicitatea, transformînd-o într-un produs inofensiv numit *toxoid*. Toxoidul este capabil să dea naștere la anticorpi și aceștia sînt apți să reacționeze nu numai cu toxoidul, dar și cu toxina, neutralizînd-o. Acest exemplu, pe care îl schematizăm în figura 9 b, arată că grupările determinante responsabile pentru toxicitatea moleculei sînt diferite de acelea care imprimă specificitatea antigenică. Mai mult, gru-

Scanned with OKEN Scanner

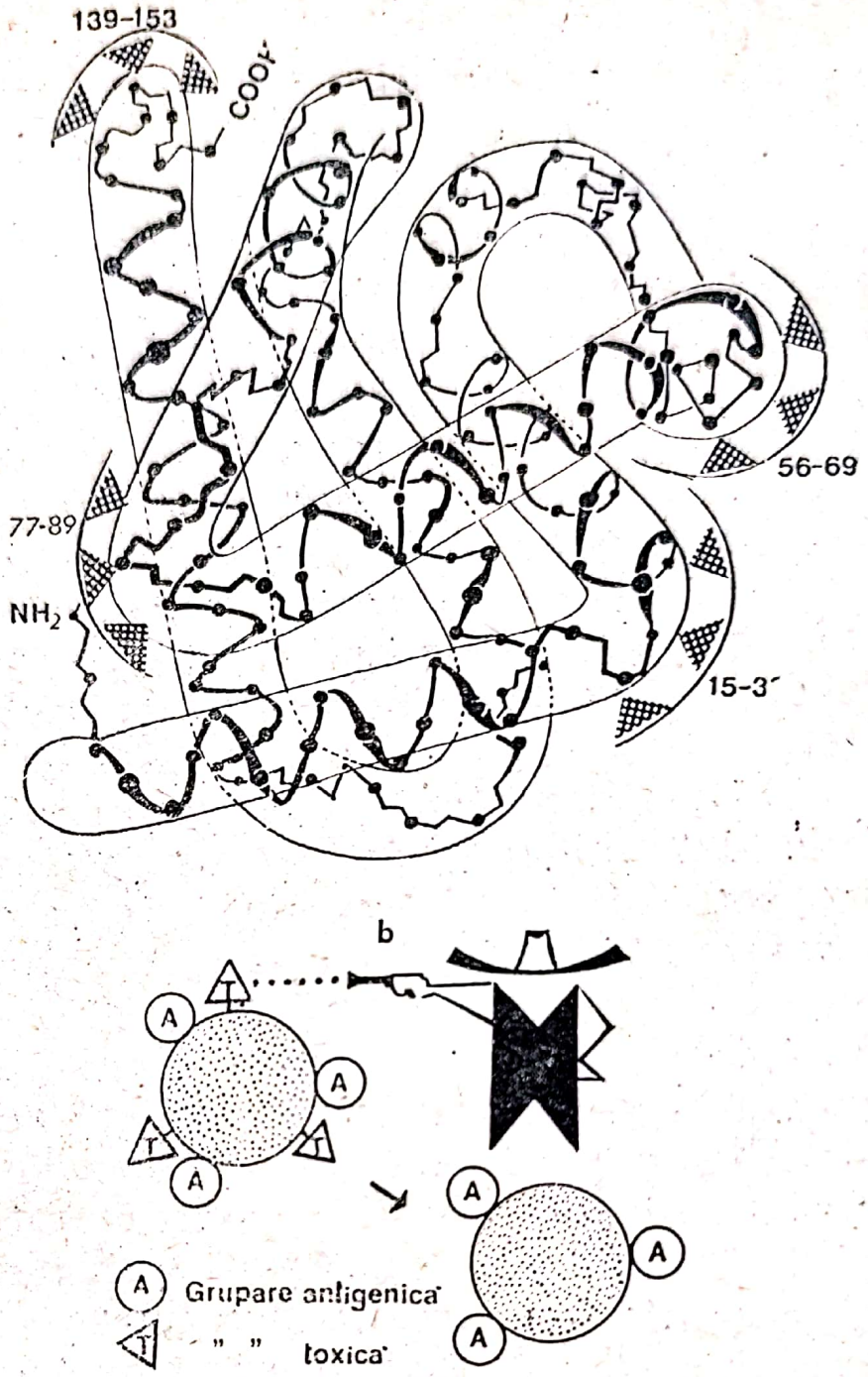


Fig. 9 — Schema care dovedește că în molecula antigenelor există mai multe feluri de grupăr. determinante

a. Mioglobina (cu săgeți s-au marcat regiunile antigenice din moleculă; punctele figurează resturile de aminoacizi din moleculă); b. Toxină — toxoid.

pările toxice trebuie să fie în vecinătatea celor responsabile pentru specificitate, deoarece combinarea anticorpilor anti-toxoid cu acestea din urmă

Scanned with OKEN Scanner

poate împiedica gruparea toxică să-și exercite acțiunea în organism. Iată un caz fericit! Dacă grupările toxice ar fi fost mai îndepărtate de cele antigenice, degeaba ar fi tratat imunologul francez Ramon toxinele sale cu formaldehidă, ele ar fi rămas toxice și după tratament.

Un exemplu mai recent este furnizat de mioglobină, o proteină devenită celebră prin faptul că i se cunoaște atît secvența aminoacizilor cît și așezarea în spațiu a lanțului polipeptidic din care este alcătuită (figura 9 a). În mioglobină s-au determinat patru zone principale care alcătuiesc grupările determinante ale moleculei. Ele sînt cuprinse între aminoacizii 15—33, 56—69, 77—89, 139—153. Se observă că aceste zone se găsesc la suprafața moleculei și, cu o excepție (zona 139—153), sînt incluse sau alipite la „colțurile" moleculei.

Utilizînd o moleculă de IgG ca antigen, constatăm că în ea există cel puțin patru feluri de grupări determinante distincte: una pe lanțul L și trei pe lanțul H, așezate în fragmentele Fd și Fc. Cercetarea proteinelor formate din subunități, așa cum sînt imunoglobulinele sau hemoglobinele, a arătat că proprietățile antigenice ale moleculei intacte nu pot fi considerate nici pe departe ca o sumă a proprietății părților care o compun. Unirea lanțurilor polipeptidice în moleculă face ca anumiți determinanți antigenici ai lanțurilor izolate să „se ascundă" în interiorul moleculei și astfel aceștia să nu mai fie accesibili pentru anticorpi. Este, de asemenea, posibil fenomenul contrar, și anume ca prin legarea lanțurilor într-o moleculă să apară grupări determi-

Scanned with OKEN Scanner

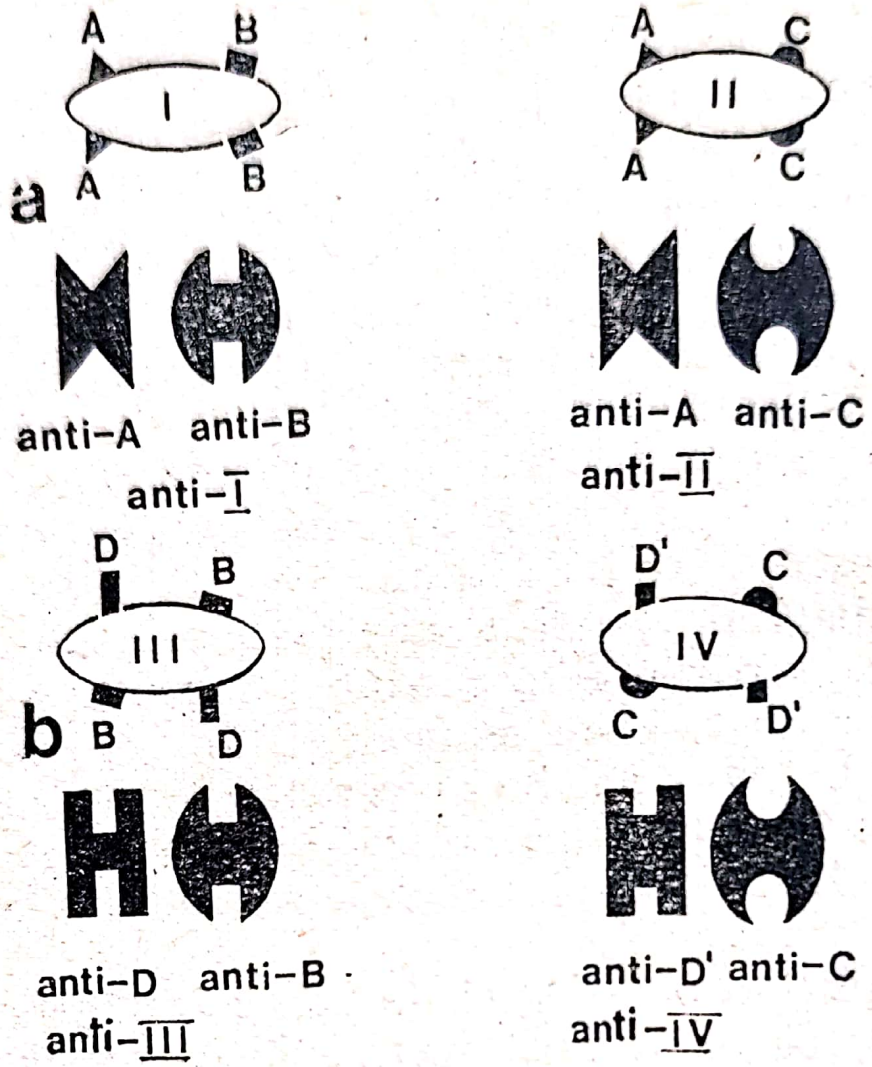


Fig. 10 — Cele două tipuri de asemănări care pot exista între antigene

a. Antigene cu grupări determinante comune (reacţie încrucişată datorată prezenţei anticorpilor anti-A în ambele antiseruri)

b. Antigene cu grupări determinante similare, dar nu identice (reacţie încrucişată datorată prezenţei anticorpilor anti-D şi anti-D' care nu disting determinanţii D şi D')

nante noi în urma interacţiunii dintre lanţuri. Această interacţiune „apropie" două sau mai multe regiuni din lanţurile polipeptidice ce alcătuiesc molecula. Se formează astfel pe suprafaţa moleculei grupări determinante alcătuite din aminoacizi proveniţi din lanţuri diferite sau din părţi

Scanned with OKEN Scanner

diferite dintr-un lanț. Aceste grupări poartă, de aceea, numele de *grupări determinante configurationale* și ele se distrug imediat ce se alterează structura nativă a moleculei. Ele trebuie deosebite de *grupările determinante secvențiale*, care rezultă dintr-o secvență particulară a unui singur lanț într-o anumită zonă de pe suprafața moleculei, așa cum este cazul mioglobinei.

Specificitatea antigenelor este ridicată, dar, evident, nu este absolută. Astfel, între diferite antigene se observă *reacții încrucișate*, care se datorează fie faptului că ele posedă în comun anumite grupări determinante, fie că între grupările lor determinante există o asemănare chimică ce nu poate fi discriminată de sistemul anticorpilor (de exemplu glicina nu poate fi deosebită de alanină, acidul glutamic de acidul aspartic). Această situație este schematizată în figura 10.

Specificitatea antigenică

Analizînd structura unui antigen extras, de exemplu, din ficatul de iepure, vom constata că acesta poate avea o sumedenie de determinanți antigenici, care pot fi grupați astfel:

a. Determinanți caracteristici speciei animalului de la care s-a izolat antigenul. Ei conferă *specificitatea de specie* și diferențiază antigenul dat de același antigen izolat de la o altă specie. Este bine să reținem că între una și aceeași proteină (de exemplu ovalbumina) extrasă de la specii diferite (găină, rață, gîscă, curcan etc.) pot

Scanned with OKEN Scanner

exista și reacții încrucișate, care arată că există similarități între grupările lor determinante. În prezent numai pentru puține proteine s-a putut stabili dacă reacția încrucișată se bazează pe anumite grupări determinante identice posedate în comun sau pe grupări determinante asemănătoare alcătuite din secvențe similare de aminoacizi.

b. Determinanți caracteristici individului de la care s-a izolat antigenul. Să ne reamintim că imunoglobulinele nu sînt identice la toți indivizii aparținînd unei specii, ci există grupe distincte de indivizi care posedă imunoglobuline diferite (vezi capitolul 3). Aceste forme de proteine le-am numit alotipi. Orice proteină poate să se prezinte sub mai multe forme alotipice, fiecare dintre ele putînd fi comună indivizilor dintr-o anumită grupă. Această *specificitate alotipică (sau de grup)* face ca oamenii să se împartă în mai multe grupe sanguine, după antigenele eritrocitare specifice pe care le poartă fiecare grup, și tot ea face ca ficatul sau inima unui individ să conțină antigene pe care alt individ le posedă și el, dar cu alte grupări determinante. De aici toate necazurile cu transplantările organelor, despre care vom vorbi mai spre sfîrșitul cărții.

c. Determinanți antigenici caracteristici organului sau țesutului din care s-a extras antigenul. *Specificitatea de organ (sau de țesut)* a fost demonstrată, pentru a cita numai una din miile de lucrări publicate pe această temă, prin experiențe în care anticorpii contra mușchilor scheletici de bou au reacționat numai cu organe conținînd o musculatură asemănătoare (de exemplu mușchiul cardiac), dar nu au fost capabili să reacționeze

Scanned with OKEN Scanner

cu antigene extrase din 30 de alte organe și țesuturi (rinichi, ficat, creier, tiroidă etc.). Această specificitate de organ a fost demonstrată în 1934 de imunologul japonez Masugi, care a injectat iepurilor anticorpi preparați pe rață contra rinichiului de iepure și a constatat că se produc leziuni, dar numai la nivelul rinichiului (glomerulonefrita acută). Aceasta a fost prima experiență care a arătat medicilor că o serie de boli cu *etiologie* necunoscută, manifestate prin suferința unor organe și țesuturi, ar putea avea cauze imunologice. Cum apar însă într-un organism anticorpi dirijați împotriva propriilor sale organe? Iată o întrebare pentru care cititorul va găsi un răspuns abia la sfîrșitul cărții (capitolul 12).

d. Determinanți caracteristici pentru funcția pe care o îndeplinește antigenul în celulă. Această *specificitate de funcție* rezultă din identitatea funcției pe care anumite proteine o îndeplinesc la specii diferite, ceea ce face ca acestea să aibă o structură primară asemănătoare. Diferențele în secvență marchează proveniența lor diferită, conferind moleculei mai degrabă o specificitate de specie decît una de funcție. Pentru o mai bună înțelegere a acestei afirmații, să luăm exemplul insulinei. Acest hormon este compus din 51 de aminoacizi, dintre care 48 sînt identici, indiferent de specia de la care se izolează insulina. Deosebirile privesc deci 3 aminoacizi, care au, pentru diferite specii, următoarea secvență: ala-ser-val (bou), tre-ser-ile (porc) și ala-gly-val (oaie). Secvența în care se produc aceste modificări nu are nimic de-a face cu funcția hormonală a acestei proteine, de aceea cele trei insuline acționează

Scanned with OKEN Scanner

aproximativ cu aceeași eficacitate asupra organismului uman. Mai mult, această minimă diferență de secvență care caracterizează *specia* nu este sesizată decît foarte greu de organism. Astfel, injectînd un cobai cu insulină de bou, el va face anticorpi specifici numai după o imunizare prelungită, efectuată în condiții speciale, și apoi anticorpii săi nu vor putea diferenția insulina de bou de cele ale altor specii, probabil datorită faptului că aminoacizii care alcătuiesc gruparea determinantă a insulinei sînt fie identici (provin din partea cu secvență comună), fie asemănători din punct de vedere imunologic. Această specificitate funcțională sau mai bine zis lipsă de specificitate funcțională este exploatată din plin la tratamentul diabetului. Injectarea zilnică a insulinelor animale la om nu determină apariția anticorpilor specifici, care ar compromite tratamentul (blocînd insulina), din cauză că insulina umană este funcțional identică cu cele animale, iar deosebirile de secvență dintre specii nu constituie grupări determinante eficiente, capabile de a da naștere anticorpilor. Să atenuăm o afirmație prea categorică și să arătăm că la unii bolnavi de diabet supuși la un tratament prelungit cu insulină apar totuși anticorpi anti-insulină, ceea ce impune creșterea treptată a dozei administrate în timpul tratamentului.

Scanned with OKEN Scanner

6

În care se enumeră condițiile care se cer unei substanțe pentru a fi antigen

Am vorbit despre antigene dintr-un punct de vedere atît de chimic încît aproape am uitat că această noțiune nu are nici o valoare dacă nu o raportăm la organismul viu, care îi dă un sens. Căci condițiile pentru ca o proteină, un polizaharid sau orice altă substanță să devină antigenică depind nu numai de proprietățile lor chimice și fizico-chimice, ci și de proprietățile organismului viu.

Străin și propriu

Prima condiție esențială pentru ca un material să fie antigenic este ca grupările determinante să nu fie prezente printre substanțele care se află

Scanned with OKEN Scanner

în mod normal în celula animalului care este imunizat. Este considerat și astăzi ca valabil dictonul folosit de Ehrlich: *natura horror autotoxicus!* (natura are oroare de autointoxicare). În limbajul imunologilor, aceasta înseamnă că animalele nu produc anticorpi față de constituenții propriului lor corp. Pentru ca o proteină sau un polizaharid să fie străine unui organism, este suficient ca ele să aibă grupări determinante care să nu existe pe moleculele corespunzătoare din celulele organismului ce produce anticorpii. De aceea, dacă vom scoate din serul unui iepure imunoglobulina și i-o vom reinjecta, nu vom constata nimic. Dacă facem acest lucru cu alți cîțiva iepuri, vom observa că unii dintre ei produc anticorpi. În sfîrșit, dacă imunoglobulina de iepure o injectăm cobailor, constatăm că majoritatea animalelor produc anticorpi. Ce spune această experiență? În primul caz iepurele n-a produs anticorpi fiindcă i s-a administrat imunoglobulina proprie. În al doilea caz, unii dintre iepuri au putut să producă anticorpi față de imunoglobulina de iepure deoarece ei aparțineau de alt grup alotipic, care se caracteriza prin prezența unei imunoglobuline puțin diferite (vezi diferența alotipică dintre lanțurile L, capitolul 3). Această diferență privea, desigur, o infimă parte din moleculă, restul fiind identic. Totuși ea a fost suficientă pentru ca iepurii imunizați să o ia drept străină și să ridice anticorpi împotriva ei. În sfîrșit, în al treilea caz, cobaii au produs anticorpi față de imunoglobulina de iepure deoarece aici există o diferență de specie. Imunoglobulina de cobai are, desigur, unele părți comune cu cea

Scanned with OKEN Scanner

de iepure, datorită faptului că la urma urmei ambele îndeplinesc aceeași funcție în organismul celor două specii, dar deosebirile de secvență se constituie în grupări determinante specifice iepurelui și împotriva cărora cobaiul produce anticorpi specifici.

Cum recunoaște un organism, respectiv celulele sale, că o proteină îi este proprie sau străină? Iată o întrebare ce va primi răspuns abia în capitolul 9, în care vom prezenta teoriile asupra formării anticorpilor.

Dimensiuni și compoziție chimică

A doua condiție este aceea ca materialul injectat să aibă o greutate moleculară suficient de mare. Această formulare este cam vagă; ea poate fi precizată mai mult, arătînd că cea mai mică proteină față de care s-a reușit să se obțină anticorpi este *hormonul pancreatic*, numit *glucagon*, cu greutate moleculară de 3.800. Desigur că intensitatea răspunsului în anticorpi este cu atît mai mare cu cît greutatea moleculară a proteinei este mai mare. De aceea, o proteină ca *hemocianina* (pigmentul respirator al unor nevertebrate), cu o greutate moleculară de cîteva milioane, determină apariția mai *grabnică* și în *cantitate mai mare* a anticorpilor decît o fac glucagonul sau alte proteine cu greutate moleculară sub 10 000. Această comportare s-ar putea explica prin aceea că, cu cît o moleculă este mai mare, cu atît șansa de a cuprinde pe suprafața sa un determinant

Scanned with OKEN Scanner

antigenic diferit de cele ale animalului imunizat este mai mare. În plus, moleculele mari scapă mai greu prin capcana rinichiului și astfel au șanse mai mari decît moleculele mici de a impresiona sistemul celular formator de anticorpi. Am putea aminti aici că pisica nu poate fi imunizată cu ovalbumină (greutate moleculară 40 000) deoarece rinichii ei sînt foarte puțin exigenți cu această proteină, lăsînd-o să treacă imediat în urină și lipsind astfel organismul de stimul.

Pe lîngă greutatea moleculară adecvată, proteinele par a mai necesita prezența unor aminoacizi caracteristici, pentru a putea acționa ca antigene. Astfel, gelatina nu este capabilă, în condiții obișnuite, să dea naștere anticorpilor. Introducînd pe cale chimică lanțuri de *politirozină* în molecula *gelatinei*, se constată apariția capacității de a induce formarea anticorpilor specifici. Efecte similare se constată prin introducerea *politriptofanului*, *polifenilalaninei* și *policisteinei*. Nu s-a constatat nici un efect prin introducerea *poliglicinei*, *polialaninei*, *acidului poliglutamic*, *polilizinei* sau *poliserinei*. Aceste antigene fabricate în laborator poartă numele de *homopolimeri*, dacă sînt alcătuiți numai dintr-un singur fel de aminoacid, sau *heteropolimeri*, dacă în compoziția lor intră 2, 3 sau mai multe feluri de aminoacizi. Aceste experiențe duc la concluzia că nucleul aromatic are o importanță deosebită pentru alcătuirea determinanților antigenici. Specificitatea imunologică a antigenelor proteice poate fi determinată într-o măsură importantă de res-

Scanned with OKEN Scanner

turile următorilor aminoacizi: *tirozină, fenilalanină, triptofan, acid glutamic, lizină* și *cisteină.*

În cazul polizaharidelor, situația este oarecum similară. S-a constatat că pentru om *dextranul,* cu o greutate moleculară de 100 000, nu este antigenic, în timp ce dextranul înalt polimerizat, a cărui greutate moleculară este în jur de un milion, poate determina formarea anticorpilor. Polizaharidele sînt constituite fie prin repetarea unor unități de zaharuri identice (de exemplu dextranul este un polimer de glucoză), fie prin repetarea unor unități constituite dintr-un număr limitat de monoglucide, cum este *polizaharidul pneumococului XVIII,* constituit din *galactoză-glucoză-glucoză-ramnoză-glucoză.* Ar părea bizar că atît de puțini componenți pot fi adunați împreună într-un mod care să asigure diversitatea de structură a polizaharidului dacă nu am ține seama de faptul că în cazul polizaharidelor este foarte important felul în care se leagă unitățile între ele. Este suficient să spunem că în urma injectării dextranului animalele formează două feluri de anticorpi: unii care acționează cu resturile *1,2-glucozil* și alții cu resturile *1,3-glucozil!* Dacă mai luăm în considerare că lanțurile polizaharidice pot avea atașate de ele „ramuri" mai scurte sau mai lungi, care conțin o varietate de derivați ai glucidelor (de exemplu *N-acetil galactozamină, fucoză, acid sialic* etc.), putem fi liniștiți că polizaharidele pot îmbrăca cele mai variate haine antigenice care să constituie grupările lor determinante.

Scanned with OKEN Scanner

A treia condiție este aceea ca antigenul să fie degradat în organism. O proteină poate avea o greutate moleculară mai mare de 10 000, să fie „plină" de tirozină și cu toate acestea să nu provoace nici un răspuns în anticorpi. Este cazul unor *poliaminoacizi sintetici* care sînt constituiți din aminoacizi din seria *D* [1]. Legăturile peptidice dintre acești aminoacizi nu pot fi desfăcute de enzimele proteolitice ale celulelor în care ajunge antigenul. Tot din acest motiv nu se pot obține anticorpi față de unele *scleroproteine* (proteine de susținere din oase, cartilaje, piele etc.), care nu sînt atacate de enzimele proteolitice.

Problema are și un alt aspect. Dacă proteinele sînt degradate în organism pînă la nivelul aminoacizilor, ele devin, de asemenea, inapte de a induce formarea anticorpilor. Se pare că acesta este cazul cu gelatina și cu unele cazeine (proteine din lapte). Rezultă deci că susceptibilitatea antigenului la degradarea enzimatică este o condiție necesară pentru ca el să poată induce formarea anticorpilor, însă numai dacă scindarea se oprește la un anumit nivel și din antigen rămîn fragmente suficient de mari pentru a putea purta grupările determinante. Cît de mari trebuie să

---

[1] *D-aminoacid.* Aminoacizii pot exista sub două forme izomere: *dextro* (D) și *levo* (L), după cum gruparea aminică este așezată în dreapta (dextro) sau în stînga (levo) atomului de carbon. Formele dextro ale aminoacizilor nu se întîlnesc în mod obișnuit în compoziția proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

fie aceste fragmente vom afla în capitolul următor consacrat „soartei" antigenului introdus într-un organism viu.

Răspunsul organismului

A patra condiţie a fost impusă de rezultatele paradoxale ale unor experienţe care au notificat că unul şi acelaşi antigen poate produce la unele animale o cantitate mare de anticorpi, la altele numai puţini anticorpi, iar la altele nu produce de loc.

Astfel, polizaharidul extras din capsula pneumococului determină formarea anticorpilor dacă este injectat la om sau la şoarece, nu însă şi la iepure. Chiar în cadrul aceleiaşi specii s-au observat diferenţe. Injectînd cu insulină două linii consanguine [1] de cobai, s-a constatat că una din ele forma anticorpi specifici, în timp ce animalele din cealaltă linie erau complet refractare. Experienţele s-au repetat de cîteva ori cu tot felul de antigene (în special poliaminoacizi) şi specii de animale (cobai, şoareci, iepuri) şi s-a ajuns la concluzia că aptitudinea de a răspunde sau de a nu răspunde la un antigen dat se transmite descendenţilor după legile mendeliene. Probabil că această diferenţă în capacitatea de răspuns se datorează prezenţei sau absenţei unei enzime capabile de a interveni fie direct asupra anti-

[1] Animale consanguine sînt cele care se obţin din cel puţin douăzeci de generaţii consecutive de încrucişări între frate şi soră.

genului (enzimă de degradare), fie asupra mecanismului prin care antigenul dirijează formarea anticorpilor.

Antigenicitate sau imunogenicitate?

Faptele enumerate mai sus au contribuit la precizarea noțiunii de *antigenicitate*. Majoritatea cercetătorilor înțeleg prin antigenicitate capacitatea materialului injectat de a da naștere anticorpilor. Se vorbește de antigenicitatea mai mare sau mai mică a unei proteine sau a unui polizaharid. În momentul în care s-a văzut că antigenicitatea depinde nu numai de proprietățile materialului, ci și de organismul la care se injectează, s-a ajuns la concluzia că noțiunea de antigenicitate nu este suficient de explicită. Astfel, o proteină putea avea antigenicitate în raport cu un animal și să fie lipsită complet de această proprietate la alt animal. S-a introdus de aceea noțiunea de *imunogenicitate*, care cuprinde atît proprietățile antigenului injectat cît și răspunsul organismului în care acesta se administrează. Sfera noțiunii de imunogenicitate este mai largă decît cea a antigenicității, raportul dintre ele putînd fi exprimat, într-o formă simplificată, prin relația: antigenicitate + răspuns în anticorpi = imunogenicitate.

Delimitarea celor două noțiuni nu este întotdeauna clară pentru toți cei ce le utilizează. De aceea ar fi poate mai bine să se definească prin antigenicitate capacitatea antigenului de a se combina cu anticorpii corespondenți și prin imu-

Scanned with OKEN Scanner

nogenicitate capacitatea antigenului de a da naștere anticorpilor. Această delimitare poate fi mai bine precizată printr-un exemplu: polimerizînd albumina serică cu un agent chimic ca *etilcloroformiatul*, se poate obține un polimer de albumină insolubil, care este capabil să reacționeze cu anticorpii produși în urma injectării iepurilor cu albumină serică nemodificată (deci polimerul are antigenicitate), dar nu este capabil să dea naștere la anticorpi, deoarece nu poate fi degradat în organismul iepurilor (deci polimerul nu are imunogenicitate).

Adjuvanții

Imunogenicitatea unei proteine, în special dacă ea are o greutate moleculară mică, poate fi crescută prin amestecarea ei cu o substanță cum ar fi gelul de hidroxid de aluminiu sau prin emulsionarea ei cu un ulei mineral. Acest fel de substanțe care măresc capacitatea antigenului de a induce formarea anticorpilor se numesc *adjuvanți*.

Adjuvantul pe bază de ulei mineral se numește, după descoperitorul său, *adjuvant Freund*. El se prepară prin amestecarea unui ulei mineral (de exemplu ulei de parafină) cu un emulgator (de exemplu lanolină) și apoi prin introducerea soluției apoase de antigen în această mixtură. Se obține o emulsie de apă în ulei, în care picăturile de apă ce conțin antigenul dizolvat în ele

Scanned with OKEN Scanner

sînt îmbrăcate cu mantaua protectoare a emulgatorului care le menține în contact cu uleiul. Rolul adjuvanților este uriaș. Amestecînd adjuvantul Freund cu gelatina, această proteină devine imunogenică determinînd formarea anticorpilor. Homopolimerii pe bază de alanină, glicină sau lizină, care, așa cum am arătat, nu sînt imunogenici, dobîndesc această proprietate în momentul în care ei sînt amestecați cu adjuvantul Freund. Latura practică a acestor descoperiri n-a întîrziat să fie exploatată de cercetători care au reușit să prepare, cu ajutorul adjuvanților, seruri antitoxice mai puternice, într-un timp mai scurt și în cantități mai mari.

Efectul adjuvanților se explică prin două mecanisme: 1) protejează antigenul împotriva unei degradări prea rapide și poate prea distructive, asigurînd astfel persistența lui îndelungată în organism; 2) stimulează nespecific diviziunea celulelor care produc anticorpi astfel că acestea devin mai numeroase, ceea ce va mări producția lor globală de anticorpi. Acest ultim efect se datorează corpilor microbieni care sînt prezenți uneori în adjuvantul Freund. Este posibil ca adjuvantul să ușureze și transportul antigenului de către fagocite spre celulele producătoare de anticorpi. Astfel, cu o soluție de IgG bovină, lipsită de orice urmă de agregat, nu se poate induce formarea anticorpilor, în timp ce agregarea moleculelor prin încălzirea soluției sau asocierea adjuvantului Freund conferă imunogenicitate materialului. Ambele tratamente au ace-

Scanned with OKEN Scanner

lași efect: măresc încorporarea antigenului în fagocite. De aceea pare rezonabil să presupunem că fabricarea anticorpilor este influențată de modul în care este transportat antigenul la celulele ce fac această sinteză. Dar această chestiune este prea importantă pentru a nu-i acorda un întreg capitol.

Scanned with OKEN Scanner

7

În care se urmărește soarta antigenului introdus în organism și se fac referiri speciale la felul în care acesta acționează asupra celulelor producătoare de anticorpi

Drumul unui antigen, din momentul în care este introdus în organism și pînă ce el se „prezintă" celulelor producătoare de anticorpi, este destul de întortocheat și nu tocmai bine cunoscut. Ca într-un veritabil labirint, antigenul trebuie să urmeze un fir conducător tot atît de trainic ca cel al Ariadnei, pentru a putea ieși la limanul celulelor ce fac anticorpi. Destinul antigenului în diferite celule ale corpului a stîrnit de timpuriu curiozitatea multor cercetători, deoarece, pe drept cuvînt, ei au presupus că celulele care „manipulează" antigenul trebuie să se numere printre acelea care fac anticorpii sau, în cel mai rău caz, sînt legate într-un fel oarecare de celulele care fac anticorpii. Vom vedea că rezultatele au confirmat presupunerea făcută.

Scanned with OKEN Scanner

Întîi a fost metoda!

Progresul cercetărilor a fost strict dependent de găsirea unor metode de „marcare" a antigenelor, care să permită urmărirea diferitelor etape ale călătoriei lor în organism. Abia la sfîrșitul anului 1939 imunologul american Sabin a reușit să coloreze în roșu un antigen atașîndu-i chimic un colorant și apoi să urmărească în ce organe și în ce celule apare culoarea roșie. S-au legat apoi de diferite antigene substanțe colorate în toate culorile spectrului solar, chiar și coloranți fluorescenți, dar rezultatele n-au fost pe măsura străduințelor. Metoda nu era bună întrucît cantitatea de antigen ce vagabonda prin diferite țesuturi și celule era prea mică pentru ca ochiul omenesc să poată vedea culoarea cu care era vopsită. Secțiunile microscopice apăreau colorate în primele momente de la introducerea antigenului „marcat", apoi culoarea se estompa și cînd lucrurile deveneau foarte interesante ochiul dezamăgit al cercetătorului nu mai vedea nimic.

Salvarea a venit de la izotopii radioactivi. Radiațiile pe care le emit aceștia pot fi detectate și măsurate chiar atunci cînd izotopii se găsesc în cantități neînchipuit de mici (un milion de milioane dintr-un gram!). Introducînd unul sau mai mulți atomi sau molecule radioactive [1]

[1] Pentru marcarea antigenelor se folosesc radioiodul (I^{131} și I^{125}) și o serie de substanțe care se pot combina cu proteinele și posedă în molecula lor un izotop radioactiv. De exemplu: acidul sulfanilic cu S^{35}, acidul antralinic cu C^{14} etc.

într-un antigen, acesta devine „marcat" și experimentatorul poate să-l urmărească în cele mai ascunse unghere ale organismului. Descartes spunea: „Pentru a cerceta adevărul lucrurilor este necesară metoda". Utilizarea antigenelor radioactive a deschis o cale spre cunoașterea adevărului despre imunitate. Și dacă pentru expunerea acestui adevăr trebuie încă să se folosească alături de fapte și destulă fantezie, de vină sînt mai puțin instrumentele de cercetare cît lipsa de date concludente.

Injectînd o suspensie de microbi omorîți în vena urechii unui iepure și luînd apoi din timp în timp din cealaltă ureche probe de sînge, constatăm că după cîteva ore antigenul dispare din sînge. Repetăm experiența, însă în loc de microbi folosim o soluție de imunoglobulină de bou radioactivă. Măsurăm după cinci minute radioactivitatea sîngelui recoltat din cealaltă ureche și apoi repetăm operația în fiecare zi. Constatăm că în primele două zile radioactivitatea scade la jumătate față de cea inițială și apoi ea continuă să se micșoreze lent pînă la a 7-a zi de la injecție, cînd antigenul radioactiv dispare brusc din circulație. Tot în această perioadă de timp își fac apariția în sîngele iepurelui anticorpii anti-imunoglobulină de bou, dovedind că eliminarea antigenului din circulație este legată de combinarea lui cu anticorpul și sechestrarea sa în altă parte a corpului. Această afirmație este cu atît mai plauzibilă cu cît injectînd aceluiași iepure o soluție de imunoglobulină de la alt iepure (față

Scanned with OKEN Scanner

de care el nu face anticorpi), se constată că ea persistă în sînge un timp mai îndelungat (mai mult de o lună), scăderea cantității ei făcîndu-se încetul cu încetul.

Interacțiunea antigenului cu macrofagul

Unde dispar corpii microbieni și imunoglobulina de bou și de ce primii sînt eliminați din circulație mai rapid decît ultimii?

Sîngele poartă atît corpii microbieni cît și imunoglobulina de bou inoculată prin toate organele pe care el le scaldă.

Unele organe (splina, ficatul, plămînii, ganglionii limfatici) sînt adevărate capcane pentru antigen, depozitîndu-l. O cantitate notabilă de antigen este fixată la nivelul ganglionilor limfatici mai ales în situația în care antigenul se administrează local, intramuscular sau subcutanat. La nivelul acestor organe, antigenul este captat de un grup de celule distincte care aparțin sistemului reticulo-endotelial. Nu poate scăpa cititorului faptul că denumirea de sistem reticulo-endotelial (*sre*) nu are o semnificație anatomică, ci una funcțională, desemnînd capacitatea unui grup de celule, răspîndite în mai tot corpul, de a fixa antigenul. Celulele ce aparțin *sre* pot staționa toată viața lor în organul în care s-au născut sau pot să o ia razna, vagabondînd prin țesuturi. Dintre acestea, cel mai interesant reprezentant este *macrofagul*, numit astfel pentru talia lui impre-

Scanned with OKEN Scanner

sionantă (de două ori mai mare decît alte fagocite). Macrofagele sînt în bună măsură responsabile pentru reținerea antigenului la nivelul unor organe. Mecanismul prin care ele captează antigenul depinde de natura acestuia din urmă. Dacă antigenul este corpuscular, așa cum ar fi o suspensie de microbi omorîți, atunci macrofagul îi mănîncă prin *fagocitoză* (*phagein* în limba greacă înseamnă a mînca), iar dacă antigenul este solubil, așa cum ar fi o soluție de imunoglobulină de bou, macrofagul o bea prin *pinocitoză* (*pinein* în limba greacă înseamnă a bea). Deci prin pinocitoză celula introduce în interiorul ei picături din lichidul extracelular riveran în care se găsește dizolvat antigenul solubil, ajuns aici pe calea sanguină. Dispariția mai rapidă din circulație a microbilor decît a imunoglobulinei ne-ar putea duce la concluzia greșită că macrofagele știu mai bine fagocita decît pinocita. În realitate însă, eliminarea mai eficientă a corpilor microbieni se datorează împrejurării că ei sînt luați în primire încă din sînge de o armată mobilă de celule specializate în fagocitoză. Este vorba de globulele albe ale sîngelui, *leucocitele*, dintre care se disting *polimorfonuclearele*, numite astfel din cauza nucleului lor care are formele cele mai bizare. Ele se mai numesc și *microfage*, din cauza taliei lor minuscule. Captați de către polimorfonucleare, microbii sînt dezmembrați și reduși pînă la elementele lor constitutive, după care leucocitul moare și își varsă conținutul în mediul înconjurător. Aceste celule au un conținut deosebit de bogat în enzime hidrolitice și se comportă

ca și cum ar fi destinate unui prînz pantagruelesc sinucigaș.

Dar să ne reîntoarcem la macrofag, pe care l-am părăsit tocmai în momentul în care, prin pinocitoză, a introdus în citoplasma sa cîteva picături dintr-un lichid ce conține dizolvat în el antigenul. Aceste picături se numesc *pinozomi* sau vezicule *micropinocitare* și sînt atît de mici încît nu pot fi văzute decît la microscopul electronic, mărindu-le de peste zece mii de ori. Cu aceasta încep pentru antigen evenimente intracelulare, prin care ia cunoștință cu *lizozomii* [1]. Pinozomul se apropie de lizozom și ei fuzionează în așa fel încît conținutul lor se amestecă, fără însă ca enzimele lizozomale să scape în citoplasmă (vezi figura 11). În interiorul acestei pungi, numită *pino-lizozom*, are loc atacarea antigenului de către acele enzime hidrolitice pentru care el reprezintă un substrat. Dacă antigenul este o proteină, el este luat în primire de catepsinele lizozomale, care încep succesiv să desfacă catena polipeptidică. S-a putut demonstra că imunoglobulina se desface mai întîi în fragmente asemănătoare cu cele ce rezultă în urma acțiunii papainei „in vitro", adică fragmentele cu greutate moleculară mai mică Fab și Fc (vezi capitolul 3). Apoi fragmentul Fc (greutate moleculară 50 000) este degradat pînă la un fragment cu greutate

---

[1] Lizozomii (vezi figura 2) sînt formațiuni intracelulare ce posedă o membrană lipo-proteică și se găsesc în citoplasma celulelor. Ei conțin întreg echipamentul enzimatic, hidrolitic al celulei. Sînt prezente enzime ce hidrolizează proteinele (catepsine), acizii nucleici (RN-aza, DN-aza), zaharurile și multe alte substanțe care se găsesc în mod normal în celulă.

Scanned with OKEN Scanner

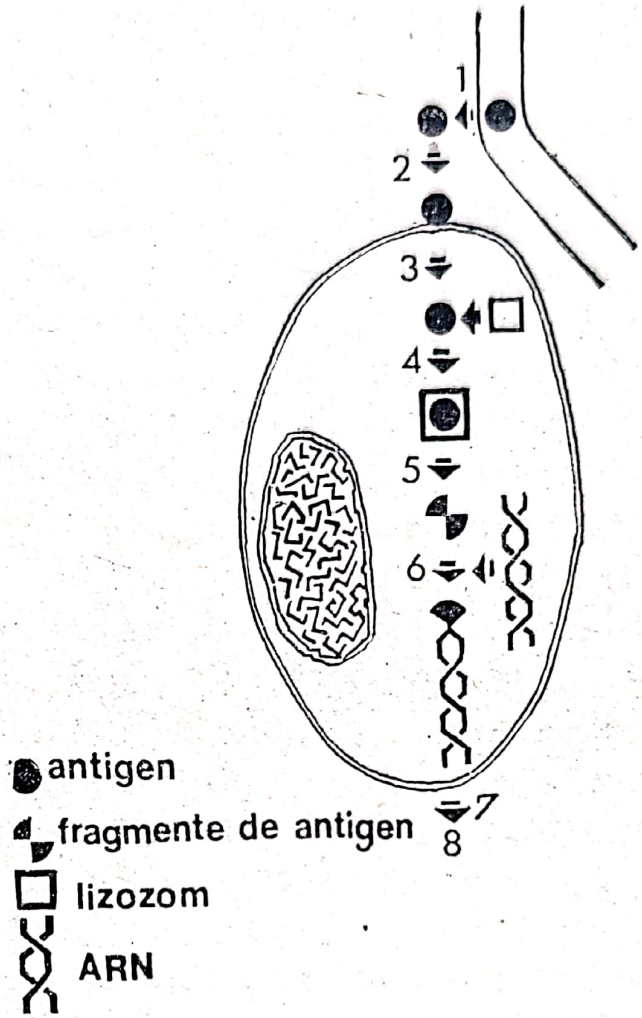


Fig. 11 — Schema etapelor de degradare intracelulară a antigenelor

1. Ieșirea din circulație; 2. adsorbția pe membrana celulei; 3. pinocitarea; 4. sechestrarea în lizozomi; 5. hidroliza; 6. cuplarea cu ARN; 7. eliminarea din celulă; 8. spre fabrica de anticorpi. (Etapele 1+2 = ingestia; 4+5 = digestia; 6+7 = excreția).

moleculară de 25 000 și acesta din urmă pînă la fragmente și mai mici, a căror greutate moleculară nu depășește 2 000—3 000. Micșorarea treptată a moleculei antigenului se face prin cooperarea dintre catepsine, a căror intervenție succesivă amintește pe cea a enzimelor proteolitice din

tractul digestiv al animalelor (tandemul pepsină-tripsină). Proteinele pot fi scindate aici pînă la nivelul aminoacizilor, dar în acest caz ele nu manifestă imunogenicitate (vezi capitolul precedent). Pentru a îndeplini această condiție, antigenul trebuie să sufere o hidroliză *limitată* care să-l descompună în fragmente cu o greutate moleculară suficient de mare pentru a putea purta unele din grupările determinante ale moleculei intacte. Mărimea acestor fragmente de antigen variază probabil după natura chimică a proteinei și susceptibilitatea legăturilor ei peptidice la atacul catepsinelor.

Superantigenele

Fragmentele de antigen care se extrag din macrofage nu sînt niciodată libere, ci se găsesc într-o strînsă asociație cu acizii ribonucleici (ARN). Fragmentele de antigen legate de ARN au căpătat denumirea de *superantigene* datorită imunogenicității lor ridicate. Dacă pentru inducerea sintezei de anticorpi la șoarece este necesar ceva mai mult de 1 microgram (a milioana parte dintr-un gram) de hemocianină, în schimb același efect se poate realiza cu o cantitate de 500 de ori mai mică de fragmente complexate cu ARN extrase din macrofage. Lizozomii scoși din celule care au pinocitat antigenul manifestă, de asemenea, o imunogenicitate crescută, ca și cum ei ar conține „superantigenul". Acest fapt sugerează că legarea fragmentelor de ARN s-ar putea realiza în lizozomi.

Scanned with OKEN Scanner

Ajuns la stadiul de fragmente complexate cu ARN, antigenul părăsește macrofagul și se îndreaptă spre celulele care fac anticorpi. Acestea sînt răspîndite tot în organele care fac captarea și prelucrarea antigenului și poartă numele de *celule limfoide*. Celulele limfoide se găsesc de multe ori în imediata vecinătate a macrofagelor, de care sînt legate prin punți fine. Prin aceste punți a fost observată o intensă circulație de bacterii și antigene marcate de la celulă la celulă și este foarte posibil ca tot pe acest drum să pornească și fragmentele de antigen de la macrofag la celulele limfoide.

Faptul că pentru formarea anticorpilor este necesar ca macrofagul să transfere antigenul celulelor limfoide a fost demonstrat printr-o experiență deosebit de izbutită, realizată de imunologul american Fishman în 1963. Dacă se pun în contact, în eprubetă, macrofagele cu antigenul (s-a folosit bacteriofagul T_2), se constată că aceste celule îl captează, dar nu produc nici un fel de anticorpi. Același efect se constată dacă se repetă experiența, însă macrofagele se înlocuiesc cu celule limfoide (limfocite). Dacă se incubează limfocitele cu un extract obținut din macrofagele care au captat antigenul, se constată că limfocitele încep să fabrice anticorpi. Analizînd compoziția extractului de macrofage, s-a constatat că responsabil pentru inducerea sintezei anticorpilor în limfocite este superantigenul[1].

---

[1] Alături de ARN legat de antigen mai există și o fracțiune de ARN care, deși nu conține antigen, poate totuși induce formarea anticorpilor. Prezența acestui ARN de tip mesager a fost confirmată de unii cercetători.

Scanned with OKEN Scanner

Fracțiunea de ARN care se prinde de fragmentele de antigen este sintetizată în macrofag înainte ca antigenul să pătrundă în celulă, are o greutate moleculară mare (constanta de sedimentare 23—28S) și este asemănătoare cu ARN-ul ribozomal. Prezența antigenului în această fracțiune se semnalează prin radioactivitate, prin capacitatea de a precipita cu anticorpii corespunzători și prin abolirea imunogenicității sale dacă se tratează cu pronază (enzimă proteolitică care distruge antigenul). Introducînd complexul antigen-ARN într-o cultură de limfocite, se constată că el induce, cam la 2 săptămîni, o sinteză de anticorpi și că aceștia sînt de tipul IgG. Anticorpii formați au alotipul identic cu cel al IgG de la animalul de la care s-au recoltat limfocitele.

Rolul ARN-ului purtător este deci acela al unui adjuvant care mărește imunogenicitatea fragmentelor, dar nu are prin el însuși nici un fel de acțiune specifică. Distrugînd ARN-ul purtător prin tratarea extractului macrofagului cu RN-ază, se constată că acesta își pierde capacitatea de a mai induce sinteza anticorpilor în limfocit.

Competența imunologică la nivel celular

Celulele limfoide, care recepționează mesajul antigenului transmis prin intermediul macrofagelor, se grupează și ele într-un sistem, care, așa cum am arătat mai înainte, se găsește în veci-

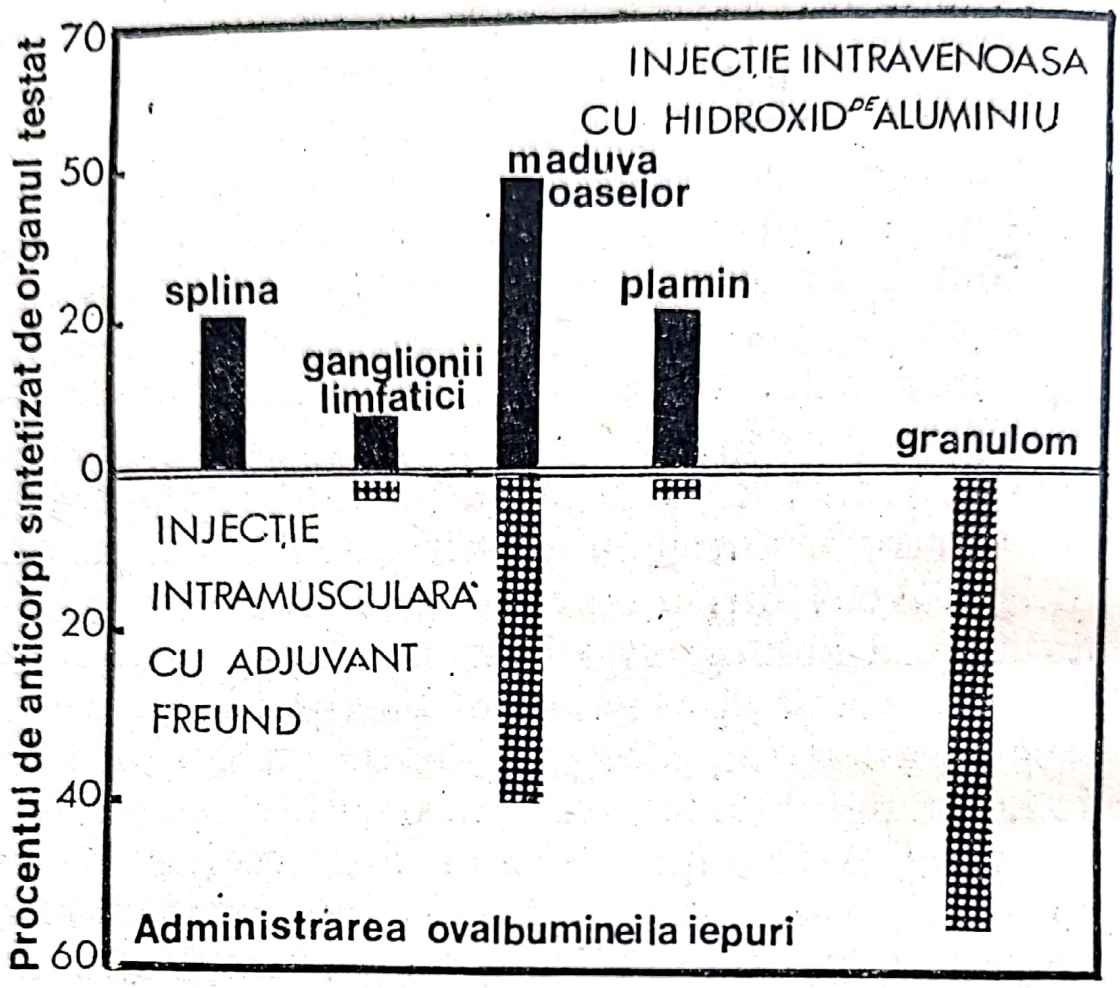


Fig. 12 — Organe unde se fabrică anticorpii și capacitatea lor de producție

nătatea *sre*, fiind găzduit în splină, ganglioni limfatici și măduva oaselor. Capacitatea diferitelor organe de a sintetiza anticorpii este redată în figura 12.

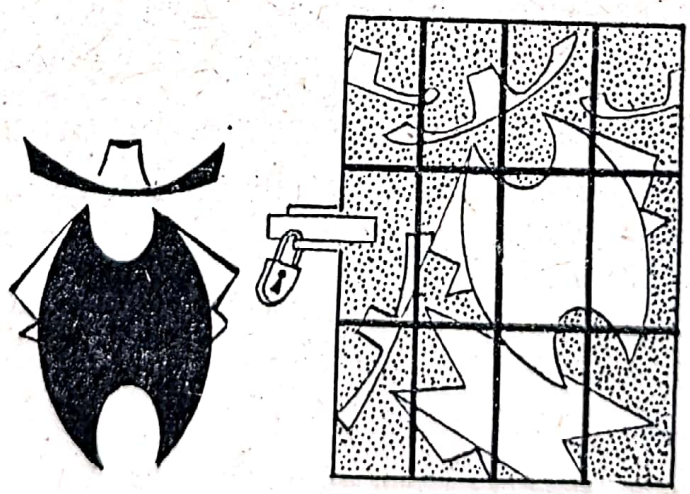
Se observă că producția locală de anticorpi depinde de locul în care s-a introdus antigenul. O injecție subcutanată sau intramusculară determină nu numai o sinteză de anticorpi preponderentă în ganglionii limfatici din regiunea inoculată, ci chiar în locul injecției. Acest lucru se întîmplă mai ales cînd antigenul asociat cu un adjuvant se administrează subcutanat și se for-

Scanned with OKEN Scanner

mează un granulom. În granulom se adună atît macrofage cît și celule limfoide, așa că după două săptămîni, cît durează „adunarea" celulelor, granulomul începe să fabrice anticorpi.

Sistemul limfoid este alcătuit din două tipuri principale de celule: *limfocite* și *celule plasmatice (plasmocite)*.

Limfocitele sînt cele mai numeroase componente ale ganglionilor (nodulilor) limfatici și ale splinei. Ele pot fi obținute din aceste organe, din sînge și, în starea cea mai pură, din ductul limfatic toracic. Sînt celule de talie mică, cu un nucleu care ocupă aproape întreaga celulă, nelăsînd pentru citoplasmă decît o coroană foarte îngustă în care există un reticul endoplasmatic rudimentar. De aceea, limfocitele sînt celule slab sintetizatoare de proteine. Majoritatea limfocitelor au o viață lungă, care durează 100—200 de zile; unele limfocite pot persista și 10 ani. Alături de limfocite apar și celule cu un diametru aproape dublu, care au fost denumite *limfoblaști* și din care, prin diviziuni repetate, se pare că se formează limfocitele.



Anticorpi în celulă și în libertate

Scanned with OKEN Scanner

Celulele plasmatice sau plasmocitele (vezi figura 2) sînt celule cu o talie mai mare decît limfocitele, avînd un nucleu localizat excentric și care are de multe ori aspectul unei roți cu spițe radiale. Citoplasma celulelor este bine reprezentată și totodată foarte bogată în acizi ribonucleici. Aici are loc o sinteză proteică intensă, ceea ce face ca celulele plasmatice să fie principalele producătoare de anticorpi ale organismului. Celula plasmatică nu se mai divide, trăiește cel mult o săptămînă și fabrică necontenit anticorpi în această scurtă dar rodnică existență. Din aceeași familie cu plasmocitele sînt și *plasmoblastul* și *plasmocitul imatur*. Se pare că aceștia nu sînt altceva decît precursori ai plasmocitului, în ordinea: plasmoblast → plasmocit imatur → plasmocit matur. Este de reținut că în toate aceste trei feluri de celule s-au pus în evidență anticorpi, însă cea mai mare producție o realizează celulele plasmatice imature care sînt, de altfel, și cele mai numeroase în momentul în care se atinge maximul de cantitate de anticorpi în sînge.

Sosirea informației antigenice la nivelul limfocitelor declanșează în acestea, înaintea oricărui proces de sinteză specifică de anticorpi, diviziune celulară și diferențiere. Apare astfel clar că nu limfocitul care a intrat în contact cu informația antigenică sintetizează anticorpi, ci numai urmașii săi cărora el le lasă „cu limbă de moarte" învățătura cea bună. După cîteva diviziuni, urmașii limfocitului încep să se diferențieze, adică să

Scanned with OKEN Scanner

prezinte deosebiri față de celula inițială. Aceste deosebiri constau în îngroșarea coroanei de citoplasmă, îmbogățirea reticulului endoplasmatic, apariția poliribozomilor, într-un cuvînt, celula dobîndește capacitatea de a face o sinteză intensă de proteină, deci de anticorpi. În acest moment, urmașii limfocitului care a recepționat informația antigenică seamănă mai mult cu celulele plasmatice decît cu strămoșul lor. Acest lucru a determinat pe unii autori să considere că limfocitul este un precursor al celulei plasmatice și să scrie următoarea secvență:

limfoblast → limfocit → (plasmoblast) → plasmocit imatur → plasmocit
↑ antigen *↑ (plasmoblast)*

Acest punct de vedere se bazează pe observația că limfocitul suferă diviziune și diferențiere în urma contactului cu antigenul și că celulele plasmatice nu apar decît în cantitate foarte mică, după o singură injecție de antigen, chiar dacă concentrația anticorpilor în sînge este notabilă; deci este nevoie de un anumit timp pentru ca să apară celule plasmatice, timp în care anticorpii sînt sintetizați de limfocitele în curs de diviziune și diferențiere.

Neținînd seama de criteriul citologic, ci numai de cel al funcționării în raport cu excitația antigenică, celulele limfoide se împart în trei categorii:

a) *celule imunocompetente*, care au potențial de formare a anticorpilor, dar care n-au intrat

Scanned with OKEN Scanner

în contact cu antigenul. Ele se mai numesc *celule neexpuse (la antigen)*, după termenul englezesc *uncommited cells*. Ele se mai numesc și *celule X*;

b) *celule imunologic activate*, care au intrat în contact cu antigenul și care rezultă în urma acțiunii specifice a antigenului asupra celulelor imunocompetente. Ele se mai numesc *celule expuse* (*commited cells* sau *primed cells*) și sînt cuprinse în grupa *celulelor* Y, care se multiplică activ;

c) *celule producătoare de anticorpi*, care secretă anticorpii și care rezultă în urma unui al doilea contact dintre celulele Y și antigen. Ele se mai numesc și *celule Z*.

Interacțiunea antigenului cu sistemul de celule care participă la formarea anticorpului este redată foarte schematizat în figura 13.

Rezultă clar că formarea anticorpilor este un proces cooperativ, în care sînt implicate cel puțin două tipuri de celule: celule fagocitare și celule limfoide.

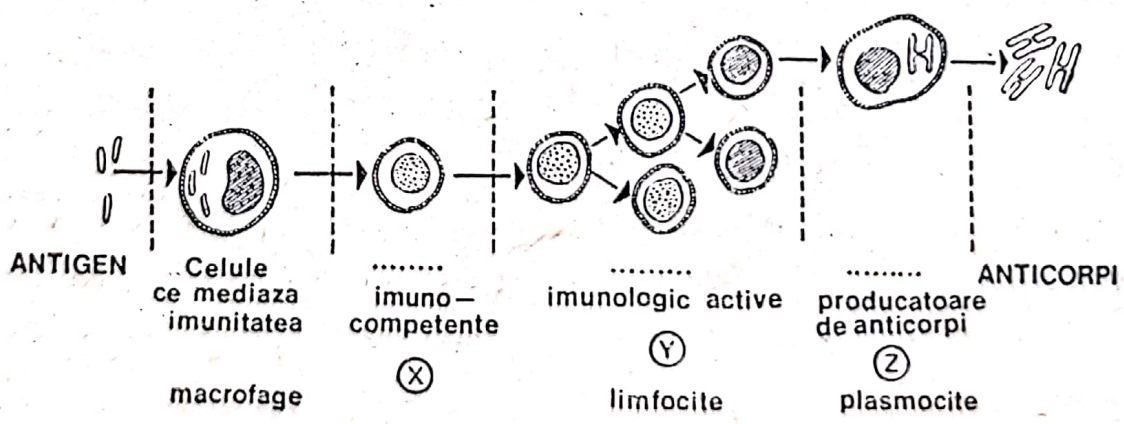


Fig. 13 — Sistemul de celule care participă la sinteza anticorpilor

Scanned with OKEN Scanner

Timusul şi originea celulelor imunocompetente

Originea celulelor limfoide din ganglionii limfatici și din splină trebuie căutată în timus[1]. Examinînd splina și ganglionii limfatici la fetuși, cercetătorii au constatat că aceste țesuturi conțin surprinzător de puține limfocite. Abia cu puțin timp înainte de naștere țesuturile limfoide sînt pur și simplu invadate de limfocite care sosesc aici pe cale limfatică de la timus. Acest proces de „colonizare" respectă criterii teritoriale riguroase: în splină, de exemplu, se găsesc zone în care toate limfocitele provin din timus și din acest motiv poartă denumirea de *arii „timus-dependente"*. După colonizare, în aceste arii, limfocitele duc o existență independentă de timus, putînd sintetiza anticorpi *și* în absența acestei glande. Această concluzie a apărut clară după experiențe pe șoareci cărora li s-a extirpat timusul înainte de colonizarea organelor limfoide și după maturizare, cînd colonizarea era deja îndeplinită. În primul caz s-a redus capacitatea organismelor de a produce anticorpi, pe cînd în al doilea caz nu s-a constatat o scădere sensibilă a acestei capacități. Această comportare sugerează că celulele imunocompetente, sau cel puțin o bună parte dintre ele, se nasc în timus fără însușirea de a sintetiza anticorpi, proprietate pe

[1] Timusul este o glandă endocrină (situată în spatele sternului), care se dezvoltă în primii ani ai copilăriei și se atrofiază la maturitate. Timusul este plin de limfocite, are și macrofage, dar... nu face anticorpi!

Scanned with OKEN Scanner

care o dobîndesc abia la noul lor domiciliu, sub influența unor factori hormonali care provin tot din timus.

Am subliniat mai sus faptul că numai o parte dintre celulele imunocompetente din splină și din ganglionii limfatici provin din timus; au fost identificate și limfocite care derivă din măduva oaselor și pentru a căror funcționare *nu* este nevoie de prezența timusului. Această constatare s-a impus mai ales prin experiențe care au arătat că un animal timectomizat și cu limfocitele distruse prin doze ridicate de raze X poate să-și restabilească parțial capacitatea de a sintetiza anticorpi dacă organismul său se „repopulează" cu celule provenite din *măduva oaselor*. Importanța limfocitelor derivate din măduva oaselor a fost integral sesizată cînd s-a observat că distrugerea lor a determinat o scădere notabilă a producției de anticorpi față de anumite antigene, deși timusul funcționa normal. Nu este deci de mirare că în momentul de față un număr mare de cercetători consideră că pentru producerea de anticorpi este necesară atît cooperarea macrofag-limfocit, cît și cooperarea dintre limfocitele care provin din timus și cele care derivă din măduva oaselor. Astăzi este răspîndită ideea că celulele derivate din timus iau primele contact cu antigenul (prelucrat sau nu de macrofag), pe care-l atașează de suprafața lor și îl prezintă ulterior limfocitelor derivate din măduva oaselor, capabile să sufere tranziția spre plasmocit și să sintetizeze astfel anticorpi.

Scanned with OKEN Scanner

O controversă: rolul complexelor antigen-ARN

În încheierea acestui capitol să ne reamintim că această cascadă de evenimente celulare este declanșată de antigen după ce acesta a trecut prin cenzura macrofagelor, stație de convertire a sa în complexe antigen-ARN. Ce rol împlinește acidul nucleic pe lîngă limfocite? Această întrebare atinge un subiect delicat, pe tema căruia se poartă încă vii discuții. Unii imunologi răspund categoric: acidul nucleic nu are nici un rol, pe simplul motiv că asociația sa cu antigenul este o consecință (nefastă) a tehnicilor imperfecte de izolare a antigenului din celule. Ei consideră că stimularea limfocitelor se face numai prin intermediul antigenului rămas *intact* la suprafața macrofagului. Antigenul pătruns în macrofag prin fagocitoză sau pinocitoză este degradat pînă la fragmente care, după acești cercetători, nu au nici o semnificație pentru elaborarea răspunsului imun.

Oponenții acestor idei consideră, dimpotrivă, că fragmentarea antigenului este o condiție *necesară* pentru manifestarea imunogenicității. Fragmentul de antigen se atașează de suprafața limfocitului, ceea ce determină o modificare a permeabilității sale celulare. Drept consecință, acidul nucleic însoțitor pătrunde în limfocit fără antigen și provoacă diviziunea și diferențierea sa. Fragmentul de antigen joacă aici rolul de cheie care deschide poarta unei anumite celule pentru acidul nucleic capabil de a iniția multiplicarea

Scanned with OKEN Scanner

și diferențierea. Fragmentul de antigen nu se poate atașa decît de *anumite* limfocite, cele care au receptori complementari pentru gruparea sa determinantă. În schimb, acidul nucleic poate declanșa diviziunea în orice limfocit în care fragmentul de antigen îi mijlocește intrarea.

Aceste două concepții diametral opuse ar putea fi reconciliate, admițînd că ambele procese coexistă în organism, anumite antigene fiind „prezentate" limfocitelor fără prelucrare enzimatică la nivelul macrofagului (antigenele cu dimensiuni reduse), iar altele necesitînd această prelucrare (antigene corpusculare și macromoleculele gigant). Dar această cale de mijloc apare eclectică animatorilor celor două curente, care resping orice „compromis", conformîndu-se întru totul aforismului blagian că „există savanți care își închipuie că fenomenele naturii sînt o imoralitate dacă nu se supun legilor pe care ei vor să li le prescrie".

Urmărindu-se distribuția antigenului sau a fragmentelor sale active în celulele implicate în răspunsul imun s-a constatat că el n-a putut fi pus în evidență niciodată în celulele plasmatice, rareori în limfocite și întotdeauna în macrofage sau pe suprafața lor. Această constatare sugerează o problemă foarte importantă, și anume cum fabrică celula plasmatică anticorpi specifici dacă în ea nu există nici antigen și nici fragmentele sale? La această întrebare vom găsi un răspuns în cele două capitole care urmează.

Scanned with OKEN Scanner

8

În care se descrie felul în care se sintetizează anticorpii în celule, dar se uită să se explice cum își lasă antigenul amprenta în molecula anticorpilor

Anticorpii sînt imunoglobuline, de aceea cercetarea felului în care se sintetizează ei în celule se poate reduce la studiul sintezei imunoglobulinelor.

Experiențele au arătat că în celulele plasmatice lanțurile ușoare și cele grele se formează separat pe poliribozomi de diferite dimensiuni, fiecare lanț sintetizîndu-se ca o unitate distinctă. Nu vom insista asupra felului în care se realizează sinteza lanțurilor, deoarece mecanismul este același ca al oricărei sinteze proteice (vezi capitolul 2). Vom arăta doar că mărimea poliribozomilor este proporțională cu aceea a lanțului sintetizat și compatibilă cu lungimea ARN-ului mesager care trebuie să codifice sinteza lor. Astfel, poliribozomii care sînt alcătuiți din 16—18 ribozomi și care pot fi precipitați cu

Scanned with OKEN Scanner

un ser imun anti-lanț H (deci conțin pe ei lanțul H în curs de formare) sintetizează lanțurile H, în timp ce un șirag mai scurt de numai 7—8 ribozomi suportă sinteza lanțului L.

Asamblarea moleculei

Dacă din splina șobolanilor imunizați cu un antigen se izolează poliribozomii, acest sistem acelular continuă să producă „in vitro" atît imunoglobulina normală cît și anticorpii față de antigenul injectat. Rupînd integritatea poliribozomilor, se constată oprirea sintezei de anticorpi, probabil datorită fracturării moleculei de ARN mesager. Această explicație arată că asamblarea celor două perechi de lanțuri L și H se realizează după ce sinteza lor separată se încheie și nu necesită intervenția nici unui mecanism enzimatic special. S-au putut pune în evidență diferiți compuși intermediari: două lanțuri grele unite între ele (H—H) sau avînd în plus și un lanț ușor (H—H—L). Cu ajutorul acestor compuși intermediari s-a putut da o schemă a etapelor de sinteză a imunoglobulinei G (figura 14). Din schemă se observă că formarea punții disulfidice între cele două lanțuri H se poate realiza fie pe poliribozomi, fie după desprinderea de pe ei, dar în orice caz asamblarea lanțului L prin intermediul legăturilor disulfidice se face în cisternele reticulului endoplasmatic în două etape succesive. Sinteza celor două feluri de lanțuri este, în mod normal, bine echilibrată, astfel că nu se produc

Scanned with OKEN Scanner

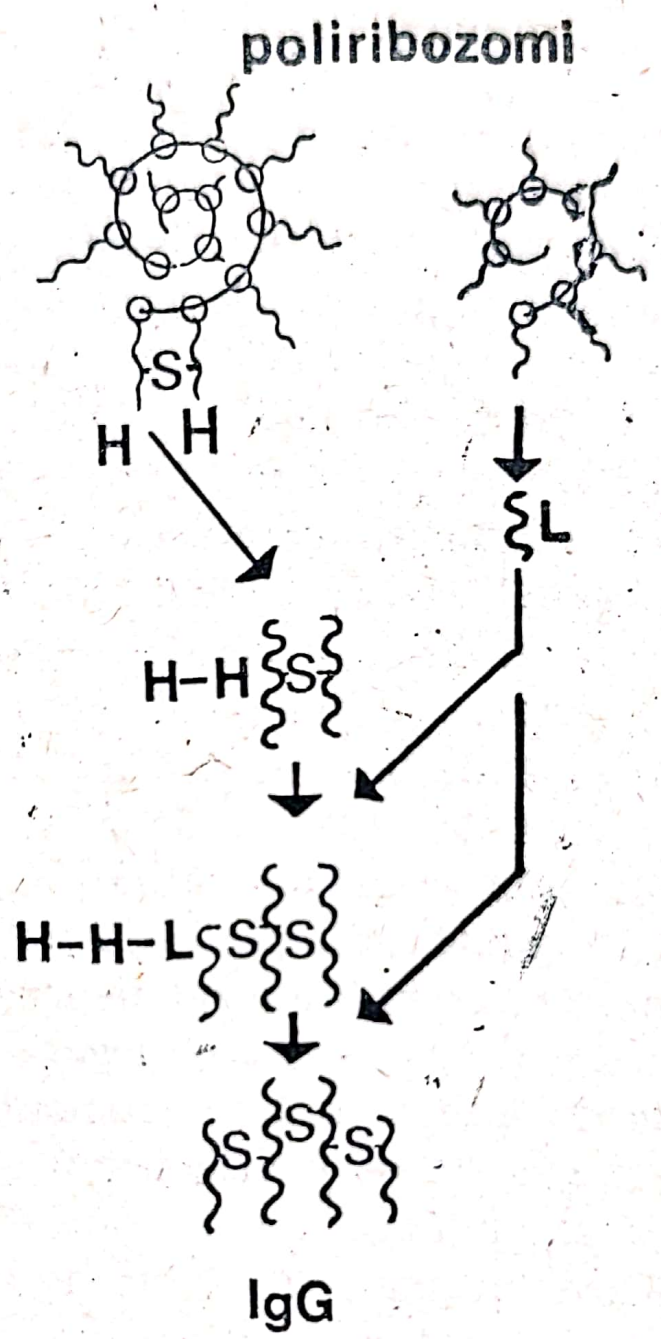


Fig. 14 — Modelul de asamblare a lanțurilor „ușoare" și „grele" în celulă
(legăturile disulfidice au fost notate cu simbolul S)

mai multe lanțuri ușoare decît grele și invers. Cu toate acestea, pare că există o mică rezervă de lanțuri ușoare care poate interacționa cu lanțul H de pe poliribozomi, ușurîndu-i eliberarea. În cazuri patologice, cum ar fi cancerul țesutu-

Scanned with OKEN Scanner

rilor limfoide, balanța sintezei celor două lanțuri se dezechilibrează și în celulele plasmatice se produce un exces de lanțuri L. Aceste lanțuri părăsesc celula, ajung în circulație și apoi le regăsim în urină ca proteine Bence-Jones. Înțelegem acum de ce proteinele B-J au fost calul troian cu care imunochimiștii au intrat în cetatea anticorpilor (vezi capitolul 3). Mai mult decît atît, în unele cazuri de mielom la șoarece s-a observat o suprimare completă a sintezei de lanțuri H, astfel că în celulele, în sîngele și în urina acestor animale, în loc de imunoglobulină, s-a pus în evidență numai lanț L.

Anticorpii sintetizați se adună în cisternele reticulului endoplasmatic și de aici ei părăsesc celula prin intermediul aparatului Golgi [1] (vezi figura 2). În cursul străbaterii acestui aparat are loc legarea carbohidraților de molecula imunoglobulinei. De fapt procesul de legare a primelor monozaharide începe încă în momentul în care lanțul H se găsește pe poliribozomi, catena polizaharidică lungindu-se tot timpul cît proteina se deplasează în aparatul Golgi; probabil că ea suferă ultimele retușuri chiar în momentul cînd scapă din încleștarea celulei. Se pare că acest proces de legare a carbohidraților este indispensabil pentru transportul intracelular și secretarea în afara celulei a imunoglobulinelor.

---

[1] Aparatul lui Golgi, o formațiune subcelulară plasată în apropierea nucleului, alcătuită dintr-o îngrămădire de corpi ovali sau rotunzi, înveliți de o membrană netedă.

Scanned with OKEN Scanner

Cîte molecule de anticorp pot fi sintetizate într-o celulă?

Să încheiem această problemă cu cîteva cifre care să dea o idee asupra duratei acestor procese care se petrec la nivel molecular. Astfel, pentru sinteza unui lanț H se consumă 60 de secunde, în timp ce pentru lanțul L sînt suficiente numai 30 de secunde. Dacă considerăm că timpul necesar pentru producerea următorului lanț H, respectiv L, este foarte mic, deoarece ele sînt deja constituite pînă aproape de capătul lor C-terminal, cînd se eliberează primele două lanțuri, și dacă neglijăm timpul necesar pentru asamblarea lor extraribozomială, ajungem la concluzia că o moleculă de imunoglobulină se sintetizează într-un minut și jumătate, cel mult două minute. Cantitatea de anticorpi pe care o sintetizează o celulă depinde de starea în care se află ea. La maximul activității sale, ea poate sintetiza pînă la 1 000 de molecule de anticorp în fiecare secundă. După ce a fost sintetizată, moleculei de IgG îi trebuie cel puțin 15 minute ca să străbată celula și să fie exportată în sînge. Rezultă clar că mecanismul de sinteză este mult mai rapid decît cel de transport, ceea ce determină o acumulare de anticorpi în celula plasmatică. Este posibil ca în momentul în care cantitatea de anticorpi depășește capacitatea de înmagazinare a celulei, aceasta să-și înceteze activitatea și să se distrugă, eliminîndu-și prețiosul conținut. Să reamintim aici că viața medie a unei celule plasmatice este doar de cîteva zile.

Scanned with OKEN Scanner

Împiedicarea fabricării anticorpilor

Sinteza anticorpilor, ca și a oricărei proteine, poate fi oprită sau încetinită dacă se administrează organismului sau celulelor izolate acele antibiotice care pot bloca verigile principale ale sintezei proteice. Astfel, *actinomicina D*, care blochează transcripția ADN-ului în ARN mesager, întîrzie răspunsul imun și inhibă formarea anticorpilor. Același efect, însă mai puțin pronunțat, îl provoacă și cloramfenicolul, cunoscut pentru capacitatea sa de a împiedica așezarea ARN-ului mesager pe ribozomi. Inhibarea sintezei anticorpilor se poate realiza și prin administrarea unor analogi ai bazelor azotate, purinice sau pirimidinice, care perturbă sinteza de ADN în celulă. Aceste substanțe, printre care mai cunoscute sînt *6-mercaptopurina*, *6-tioguanina* și *8-azaguanina*, suprimă formarea anticorpilor numai dacă sînt administrate concomitent cu antigenul. În sfîrșit, inhibiția eficientă a sintezei anticorpilor se poate realiza și prin administrarea unor substanțe cu o structură asemănătoare cu cea a aminoacizilor și care sînt încorporate „din greșeală" de ARN-ul de transfer în lanțurile polipeptidice H și L și astfel le încetinesc și chiar le opresc formarea. O parte din aceste substanțe inhibitoare au încetat de mult să fie doar simple instrumente de cercetare, ci s-au constituit în prețioase medicamente cu care se combat fenomenele de respingere a transplantelor (vezi capitolul 12).

Scanned with OKEN Scanner

Succesiunea IgM-IgG

Urmărind activitatea sintetizatoare a unei populații de celule plasmatice, se observă că se formează la începutul procesului anticorpi aparținînd tipului IgM și apoi apar cei de tip IgG (vezi capitolul 4 și figura 8). Această constatare nu este ireproșabilă deoarece tehnicile actuale detectează mai ușor anticorpii IgM decît pe cei IgG, astfel că s-ar putea prea bine ca apariția lor să fie concomitentă. În prezent nu se poate afirma dacă o celulă care are capacitatea de a sintetiza un anticorp de tip IgM își deconectează această sinteză și conectează sinteza anticorpilor IgG, sau schimbarea semnalată se petrece la un moment dat în celulele fiice, nepoate sau strănepoate. De aceea, pînă în prezent nu se poate spune dacă una și aceeași celulă este capabilă să facă *concomitent* sau *succesiv* anticorpi de tip IgM și IgG sau dacă este vorba de apariția însușirii de a sintetiza IgG la o celulă ce descinde dintr-o celulă ce sintetizează IgM. Dacă acest fenomen este încă obiectul unor discuții înverșunate, în care pentru a susține o părere sau alta cercetătorii născocesc metode din ce în ce mai subtile care ajung la studiul unei *singure* celule izolate, se pare că apele s-au liniștit în ceea ce privește cunoașterea capacității celulelor de a sintetiza unul sau mai mulți anticorpi cu o specificitate diferită. Astăzi, majoritatea autorilor susțin concepția: *o celulă — un anticorp*, adică ei admit că o singură celulă nu știe să facă decît anticorpi cu o singură specificitate. Urmă-

Scanned with OKEN Scanner

rindu-se capacitatea celulelor izolate, luate individual, de a produce tot atîția anticorpi cîte antigene s-au folosit la injectare, s-a ajuns la concluzia că există celule care fac anticorpi cu o specificitate dată, alte celule fabrică anticorpi cu o altă specificitate, dar că niciodată o celulă nu poate face două sau mai multe feluri de anticorpi cu specificități diferite. Cercetătorii care au arătat acest lucru susțin deci că celulele sînt unipotențiale, adică au o capacitate înnăscută de a produce un singur fel de anticorp. Ei contestă vehement rezultatele acelor oameni (și nu sînt tocmai puțini) care au avut „neșansa" să arate că o celulă poate fi dublă sau chiar triplă producătoare de anticorpi. Aceștia sînt acuzați că au produs experiențe care au lacune tehnice, ceea ce este un fel politicos de a spune că sînt experimentatori neîndemînatici. Ideea că o celulă este pluripotențială nu prea se bucură astăzi de popularitate, deoarece ea contravine dogmei selecționiste (vezi capitolul următor). Dar nimeni nu poate garanta că apele liniștite în care plutesc imunologii de astăzi nu vor fi agitate mîine de valurile noilor experiențe.

Răspunsul primar

După expulzarea lor din celule, anticorpii ajung în sînge. Dinamica apariției lor aici depinde de numărul injecțiilor cu antigen care au fost administrate animalului.

Dacă animalul primește o singură injecție dintr-un antigen solubil, se constată că anticorpii

Scanned with OKEN Scanner

apar în circulație după puține zile, concentrația lor crește cîteva zile la rînd pînă la un maxim și apoi descrește încet pînă la valori foarte scăzute. Răspunsul în anticorpi care urmează inoculării unei singure doze de antigen se numește *răspuns primar*. Anticorpii formați în acest răspuns aparțin mai ales tipului IgM, dar spre sfîrșitul intervalului apar și anticorpi de tip IgG. Timpul care trece de la injectarea antigenului și pînă la apariția anticorpilor în sînge este determinat de următoarele împrejurări: a) timpul necesar ca antigenul să ajungă în celulă și aceasta să-și fabrice anticorpi; b) prezența antigenului în sînge și combinarea lui cu anticorpii pe măsură ce aceștia se formează, și c) diluarea enormă a anticorpilor în serul sanguin și în lichidul extravascular și sensibilitatea metodelor de detectare a anticorpilor.

Timpul cel mai scurt în care s-a putut evidenția un răspuns specific la nivel celular ca urmare a inoculării antigenului este de șapte minute și jumătate. Injectînd hematii de pasăre în pernița de la laba piciorului unui iepure, s-a observat că acestea ajung în cîteva secunde în ganglionul popliteal așezat în zona genunchiului, dar încep să fie distruse după aproximativ șapte minute ca urmare a acțiunii probabile a anticorpilor. În suspensii de celule de splină incubate „in vitro" cu eritrocite străine, s-a putut observa apariția anticorpilor după 24 de ore, fără însă ca celula să se dividă. Diviziunea celulelor începe după această pauză de o zi și ea își atinge maximul după două zile, timp în care secreția de anticorpi crește mereu.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenul injectat apare în sînge indiferent de faptul că el a fost inoculat direct aici sau pe o cale ocolită: intraperitoneală, intramusculară sau subcutanată. Pe măsură ce este trecut în spațiul extravascular și apoi captat de celulele specializate, el scade continuu, dar rămîne încă în sînge în cantitate suficientă pentru a fixa primele cantități de anticorpi care sînt aruncate pe piață de celulele care au recepționat avangarda mesajului antigenic și s-au conformat ordinelor de a iniția sinteza anticorpilor. De aceea, apariția anticorpilor în sînge se poate semnala abia atunci cînd cantitatea lor în continuă creștere depășește pe cea a antigenului în continuă scădere.

Prezența anticorpilor în sînge este observată cu ajutorul unor metode imunochimice care se bazează pe capacitatea lor de a reacționa cu antigenul „in vitro" în mod vizibil. Aceste metode au sensibilitate diferită sau, cu alte cuvinte, unele pot semnaliza anticorpii aflați în cantitate mai mică decît o pot face altele. Astfel, injectînd ovalbumină iepurelui, vom constata că serul acestuia devine apt de a precipita ovalbumina în eprubetă după 7—8 zile, în timp ce legînd ovalbumina de niște eritrocite de berbec și amestecîndu-le cu serul vom constata că eritrocitele sînt aglutinate chiar de serul recoltat la 3—4 zile de la inoculare. Deci anticorpii sînt prezenți în sînge la trei zile de la injectarea ovalbuminei, dar prin reacția de precipitare noi nu-i putem pune în evidență decît după 7—8 zile.

Creșterea cantității de anticorpi în sînge în urma unei singure injecții cu antigen nu se datorează faptului că fabrica de anticorpi produce

Scanned with OKEN Scanner

din ce în ce mai mult (deşi nici acest lucru nu este imposibil!), ci fiindcă se creează din ce în ce mai multe fabrici, adică celulele formatoare se multiplică şi devin din ce în ce mai numeroase. Cantitatea totală de anticorpi care apare în sînge depinde deci de durata vieţii unei celule producătoare (7—8 ore pentru celulele din splină), de numărul de generaţii de celule care se succed la sinteză (numărul total de celule) şi, desigur, de cantitatea medie de anticorpi pe care o produce o singură celulă.

Răspunsul secundar şi celulele cu memorie

Dacă antigenul întrebuinţat la prima stimulare este reinjectat la cîtva timp (săptămîni sau chiar luni) animalul îşi „reaminteşte" de prima sa experienţă şi fabrică anticorpi mai repede şi în cantitate pînă la o sută de ori mai mare decît după prima injecţie. Această reacţie tipică se numeşte *răspuns secundar* sau *anamnestic* (în limba greacă *anamnesis* înseamnă amintire). Repetînd injecţiile, animalul se *hiperimunizează* şi produce cantităţi mari de anticorpi. Astfel, se pot atinge valori de 10 mg anticorp/ml ser, ceea ce înseamnă mai mult de 10% din toate proteinele serului.

Anticorpii formaţi în răspunsul secundar sau în hiperimunizare diferă de cei formaţi în răspunsul primar prin faptul că aparţin aproape exclusiv tipului IgG şi că au o mare afinitate de combinare

Scanned with OKEN Scanner

cu antigenul. Creșterea rapidă a cantității de anticorpi după a doua injecție este cauzată de creșterea numărului de celule care formează anticorpii. Ele pot fi de o sută de ori mai numeroase decît în răspunsul primar. Așa se explică de ce pentru o singură moleculă de toxoid difteric se formează în timp de trei săptămîni un milion de molecule de anticorpi specifici.

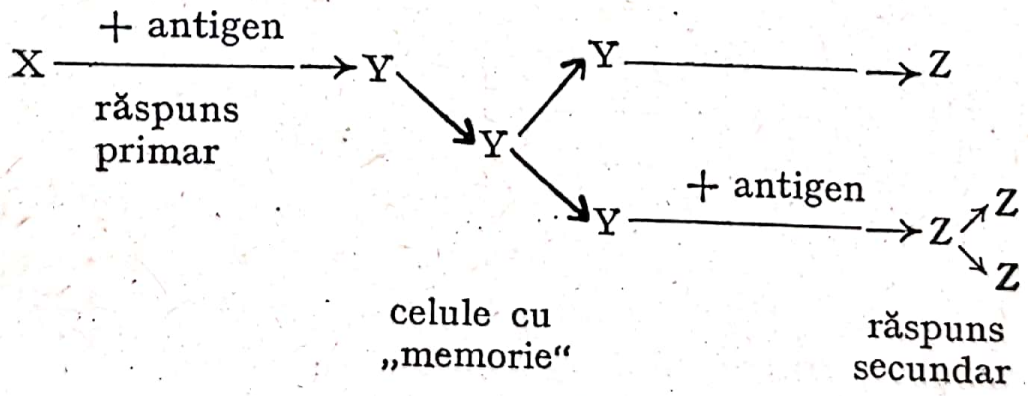
Diferența esențială dintre răspunsul primar și cel secundar constă în aceea că la reinjectarea antigenului acesta întîlnește cantități mici de anticorpi formați în timpul răspunsului primar, cu care se unește și formează complexe antigen-anticorp. Aceste complexe sînt mai eficient fixate de celulele fagocitare și astfel ajung mai repede la nivelul celulelor anticorpo-formatoare. De aceea, răspunsul secundar este mai rapid decît cel primar; cel mai scurt interval de timp necesar elaborării unui răspuns specific secundar, care s-a evidențiat în celule pînă acum, este de o jumătate de minut. Intervenția anticorpilor gata formați și complexarea antigenului, presupuse a fi decisive în rapiditatea și intensitatea răspunsului secundar, își găsesc un sprijin indirect în faptul că antigenele corpusculare (bacterii, virusuri, eritrocite) nu dau un răspuns secundar sensibil diferit de cel primar. Probabil din cauză că ele sînt suficient de „voluminoase" pentru ca intervenția anticorpilor să nu schimbe prea mult viteza și modul în care sînt prelucrate de organism.

Diferența dintre răspunsul primar și cel secundar poate fi explicată și prin argumente de ordin celular. Dacă în răspunsul primar antigenul reali-

Scanned with OKEN Scanner

zează trecerea celulelor de tip *X* în celule de tip *Y* și proliferarea acestora din urmă, a doua injecție va găsi deja un număr mare de celule *Y* gata formate, care produc cantități mici de anticorpi și care, prin interacțiune cu antigenul, se vor diferenția în celule de tip *Z*, principalele producătoare de anticorpi.

Deoarece trecerea celulelor de la stadiul *Y* la *Z* este mai rapidă decît trecerea de la *X* la *Z*, înțelegem de ce răspunsul secundar apare mai rapid decît cel primar. Cantitatea mai mare de anticorpi produși în răspunsul secundar se explică prin existența celulelor Y „cu memorie" din care se recrutează un număr mai mare de celule de tip *Z* decît în răspunsul primar. Trebuie subliniat încă o dată că creșterea cantității de anticorpi în răspunsul secundar se datorează faptului că în acest caz există mai multe celule producătoare de anticorpi (*Z*) și nu faptului că fiecare celulă sintetizează mai mulți anticorpi. Producția de o mie de molecule pe secundă, pe celulă, a fost găsită atît în răspunsul primar cît și în cel secundar.



Această schemă arată că este foarte greu de afirmat că în urma administrării unei singure doze de antigen se obține un răspuns primar

„pur". Apare evident că totul depinde de doza administrată. Dacă se administrează o cantitate mică de antigen, aceasta poate fi suficientă numai pentru trecerea celulelor *X* în celule *Y*, dar nu și pentru trecerea lor în celule *Z*. Dacă însă doza de antigen administrată este mai mare sau se asociază cu adjuvant, astfel ca el să se conserve și să persiste mai mult în organism, atunci se poate ca o singură injecție să fie suficientă și pentru o stimulare a celulelor *Y* și o trecere a lor în celule *Z*. În acest caz, cu o singură injecție se realizează un răspuns „amestecat": primar și secundar.

Paralizia imunologică

Dacă se depășește capacitatea de prelucrare a macrofagelor [1] (administrîndu-se prea mult antigen) sau se scade capacitatea lor de prelucrare, atunci antigenul poate să ajungă *direct* în contact cu celulele imunocompetente. Rezultatul acestei uniri este nefast pentru celulă. Ea se blochează și nu mai poate produce nici descendenți și nici anticorpi. De aceea, supradozarea antigenului duce la o anulare a reactivității imunologice a animalului, stare care se numește *paralizie imunologică*. Dacă pentru un răspuns imun este necesar ca *fragmentele* de antigen să interacționeze cu celulele imunologic competente (*X*) sau activate (*Y*), rezultă că îndepărtarea lor de la

[1] Reamintim că antigenul nu interacționează cu limfocitele decît după ce a fost prelucrat de macrofage.

Scanned with OKEN Scanner

acest nivel ar trebui să ducă la suprimarea formării anticorpilor. Într-adevăr, s-a arătat că formarea anticorpilor într-un organism poate fi complet suprimată dacă se injectează ... anticorpi. Astfel, dacă se injectează unor șoareci eritrocite de berbec și, după ce în sîngele lor apar anticorpii specifici, se administrează o cantitate de ser de șoarece anti-eritrocite de berbec, se constată că se suprimă sinteza de anticorpi. Sînt sensibili la acest tratament mai ales anticorpii de tip IgM. Deoarece această inhibiție este efectuată de anticorpii de tip IgG, unii autori au avansat ideea că încetinirea și oprirea sintezei de anticorpi de tip IgM în cursul unui răspuns imun se datorează apariției anticorpilor de tip IgG care exercită *o represie*, închizînd sinteza anticorpilor IgM. Această reglare a raporturilor dintre IgM și IgG s-ar putea datora împrejurării că anticorpii IgG, avînd o afinitate mai mare pentru antigen decît cei IgM, îl fixează și îl îndepărtează din sistem. Deoarece celulele care fac anticorpi de tip IgM au nevoie de prezența „permanentă" a antigenului, îndepărtarea treptată a acestuia le încetinește și apoi le oprește sinteza. Deci inhibarea sintezei anticorpilor prin anticorpi se explică prin aceea că anticorpii administrați îndepărtează din regiunea formatoare de anticorpi stimulul antigenic, ceea ce face ca numai celulele deja expuse să continue fabricarea anticorpilor atît timp cît trăiesc, după care sinteza se oprește.

Scanned with OKEN Scanner

9

În care se completează ceea ce s-a uitat să se spună în capitolul precedent și se prezintă teoriile asupra formării anticorpilor

În anul 1900, în fața unei selecte adunări de savanți de la Societatea Regală Engleză, Paul Ehrlich și-a susținut teoria sa cu privire la felul în care celulele fabrică anticorpii. Gestul său era cu atît mai îndrăzneț, cu cît la începutul secolului nostru nu se știa nimic sau aproape nimic despre natura chimică a anticorpilor. Dar acest „neînsemnat" detaliu nu l-a tulburat de loc pe Ehrlich, care a prezentat fantastica sa schemă cu celule-caracatiță înarmate cu brațe numite anticorpi. Astfel a fost lansată prima teorie asupra mecanismului imunității dobîndite, care, în ciuda unei eclipse de zeci de ani, strălucește și astăzi. Născută dintr-o nedumerire și construită dintr-o analogie atît de strînsă cu structura chimică a nucleului aromatic al benzenului încît irita pe medici și bio-

Scanned with OKEN Scanner

logi, *teoria catenelor laterale* l-a ridicat pe creatorul ei la rangul de părinte al imunochimiei.

Ehrlich presupunea că organismul animal produce diferite tipuri de celule care au pe suprafața lor *receptori* (citește anticorpi), ce sînt astfel construiți încît pot să se combine cu orice fel de antigen, fie el o bacterie sau o proteină. Antigenul combinat cu receptorii de pe suprafața celulelor îi scoate din funcțiune și atunci celula, stimulată, nu numai că își regenerează receptorii blocați, dar îi produce într-o cantitate atît de mare încît ei nu mai „încap" în celulă și se detașează, circulînd în sînge ca anticorpi. Cum pe suprafața celulelor există receptori de diferite tipuri, acțiunea antigenului va depinde de afinitatea lui față de anumiți receptori. Astfel, antigenul *selecționează* din numărul imens de receptori de diferite tipuri numai pe cei care au structură complementară cu a sa; numai celulele pe care se găsesc aceștia vor avea funcțiunile lezate de intervenția antigenului și se vor apuca de producția de receptori (anticorpi). Ehrlich, mare amator de aforisme, era convins că *corpora non agunt nisi fixata* (corpurile nu acționează dacă nu sînt fixate), de aceea presupunea că dacă antigenul nu se fixează de celule, nici organismul care le conține nu este capabil să formeze anticorpi. Nu pot scăpa nimănui două trăsături esențiale ale acestei teorii: a) că în celule există anticorpi preformați, care au înscriși în ei toate specificitățile posibile, deci specificitatea este preexistentă introducerii antigenului, și b) că antigenul nu face altceva decît selecționează acele celule care posedă receptori-anticorpi ce se potrivesc la grupările sale

Scanned with OKEN Scanner

determinante și astfel impulsionează sinteza anticorpilor.

Teoria lui Ehrlich a fost considerată de mulți specialiști ca prea speculativă și fantastică, deoarece bagajul de fapte experimentale pe care se bizuia era foarte sărac. Să ne reamintim că pe atunci nu era clar nici măcar faptul că grupările determinante ale unor bacterii sînt grupări chimice cu o structură bine definită și nici măcar nu se bănuia că moleculele proteice au o dimensiune și o conformație care se mențin chiar și în soluție. De ce să ne mai mirăm atunci că în momentul cînd Landsteiner a arătat că celulele pot să facă anticorpi față de un mare număr de substanțe chimice artificiale (haptene) au apărut nori negri pe orizontul teoriei lui Ehrlich cuprinși în întrebarea, aproape hamletiană: cum poate un organism să aibă anticorpi preformați față de o haptenă sintetică care nu se găsește niciodată în natură?

Teoria selecției clonale

Cînd în 1930 Haurowitz a publicat teoria sa cu privire la modul în care își imprimă antigenul tiparul în celulele anticorpo-formatoare, teorie care explica cum se pot forma anticorpi față de substanțe care nu se găsesc niciodată în natură, teoria lui Ehrlich a început să fie amintită în tratatele de imunologie în subsidiar, ca o antichitate cel mult ingenioasă. Vreme îndelungată nu s-a mai vorbit nimic (bun) de teoria lui Ehr-

Scanned with OKEN Scanner

lich, pentru ca în 1957, după mai bine de o jumătate de veac de la elaborarea ei, ea să renască precum pasărea Phoenix. Reziditorul ei a fost renumitul imunolog australian Sir Mac Farlane Burnet și opera sa se numește *teoria selecției clonale*. Burnet presupune că în organism există o populație de celule imunocompetente alcătuite în special din limfocite, care poartă pe suprafața lor anticorpi, fiecare celulă avînd anticorpi cu o specificitate dată. În momentul în care în organism ajunge sau se introduce un antigen, acesta „selecționează" dintre celulele imunocompetente pe aceea care poartă pe suprafața ei anticorpii cu o structură complementară. În urma fixării antigenului de celulă, ea începe să se dividă, dînd naștere unei *clone*, adică unei populații de celule ce se formează prin diviziunea repetată a unei singure celule. Toți membrii unei clone vor avea capacitatea de a forma anticorpul pe care celula cap de clonă știa să-l facă și îl purta pe suprafața ei. Rezultă că fiecare celulă imunocompetentă poate să formeze anticorpi numai cu o *singură* specificitate. Cititorul poate observa singur punctele comune dintre teoriile lui Ehrlich și Burnet, noi vom releva doar diferențele, și anume: 1. Ehrlich presupune că o celulă este multipotentă, adică pe suprafața ei se găsesc receptori-anticorpi cu specificități diferite, pe cînd Burnet consideră celula formatoare de anticorpi unipotentă. În consecință, pentru Ehrlich antigenul exercită o selecție la nivelul receptorilor-anticorpi, pe cînd pentru Burnet această selecție se exercită la nivelul celulelor. De aceea, după concepția lui Ehrlich, o celulă ar putea face două

Scanned with OKEN Scanner

sau mai multe feluri de anticorpi, pe cînd după Burnet celula nu este capabilă să facă decît anticorpi cu o singură specificitate. 2. Ehrlich consideră că sinteza de anticorpi se declanșează în urma tendinței celulelor de a înlocui receptorii scoși din funcțiune prin combinarea lor cu antigenul, pe cînd după Burnet fixarea antigenului de receptorii superficiali declanșează diviziunea celulei și diferențierea celulelor fiice, ele fiind acelea care produc efectiv anticorpi.

Teoria selecției clonale se bazează pe cîteva date experimentale, dintre care vom aminti pe cele mai importante: a) Limfocitele au capacitatea de a sintetiza anticorpi în cantități mici, fără însă a fi producătoare efective de anticorpi; această funcție revine celulelor plasmatice, care sînt considerate ca derivînd din limfocite prin diviziune și diferențiere. b) Antigenul este capabil să inducă diviziunea limfocitelor. c) Pe suprafața limfocitelor există receptori care sînt imunoglobuline IgM. d) Distrugerea limfocitelor, care sînt capabile să fixeze un anumit antigen, abolește capacitatea organismului de a mai face anticorpi față de acest antigen, dar nu și față de alții. e) O celulă nu poate să facă decît anticorpi cu o singură specificitate (vezi și capitolul precedent).

Nici teoria lui Burnet și nici cea a lui Ehrlich nu au scăpat de întrebarea cheie: cum se explică faptul că în organism există atît de multe celule preadaptate la un număr infinit de antigene naturale și mai ales sintetice?

Înainte de a prezenta răspunsul teoriei clonale la această întrebare incomodă, să încercăm să precizăm numărul specificităților preadaptate

Scanned with OKEN Scanner

ale anticorpilor dintr-un organism care ar acoperi complet toate antigenele posibile. Cu alte cuvinte, să arătăm că pentru un număr *infinit* de antigene posibile este necesar numai un număr *finit* de feluri de anticorpi. Deoarece situsul de combinare al anticorpilor nu este format, în medie, din mai mult de 6 aminoacizi, numărul maxim de combinații care se pot face cu cei 20 de aminoacizi care intră în compoziția proteinelor, așezîndu-i în grupuri de cîte 6, este de 20^6, adică $64 \times 10^6 = 64\,000\,000$. Acest număr este în realitate mai mic, deoarece în situsul de combinare nu pot intra, din rațiuni de ordin structural, anumiți aminoacizi (prolina, triptofanul), fiind preferați aminoacizii nepolari. Această împrejurare reduce numărul de combinații posibile de la cîteva zeci de milioane, așa cum am calculat, la cîteva sute de mii și chiar zeci de mii. Se poate presupune că $10^4 - 10^5$ imunoglobuline vor fi suficiente pentru a se combina specific cu orice grupare determinantă naturală sau sintetică. Unii autori consideră că există 50 000 de anticorpi diferiți pe care un organism este capabil să-i formeze, ceea ce înseamnă că în organism există 50 000 de celule cap de clonă diferite, fiecare fiind capabilă să formeze un singur fel de anticorp.

A răspunde deci la principala obiecție formulată împotriva teoriei lui Burnet este de a dovedi că în organism există 50 000 de feluri de imunoglobuline, fiecare dintre ele diferind prin structura primară. Acum mai bine de 10 ani, cînd s-a enunțat teoria, această condiție era considerată de chimiști ca o erezie. Toată lumea știa atunci că o proteină oarecare, ovalbumina de exemplu,

Scanned with OKEN Scanner

este alcătuită dintr-o populație de molecule identice una cu cealaltă. Dacă nu ar fi fost așa, nu am fi putut determina secvența aminoacizilor în proteine. Or, secvența se putea determina și dovadă erau lucrările de acest fel care apăreau ca ciupercile după ploaie. Între timp însă, în anii 1965—1966, au apărut primele lucrări care semnalau marea heterogenitate a imunoglobulinelor, faptul că atît lanțul L cît și fragmentul Fd posedă 30—40 de resturi de aminoacizi care variază de la imunoglobulină la imunoglobulină (vezi capitolul 3 și figura 6). Un calcul simplu arată că, dacă în lanțul ușor există 40 de poziții în care un aminoacid poate fi înlocuit cu altul, se pot face un număr de 2^{40} combinații posibile, ceea ce înseamnă mai mult de 10^{10} lanțuri L. Cum se pare că și lanțul greu prezintă aceeași comportare, rezultă că din combinarea lor se pot forma 10^{20} imunoglobuline diferite. Desigur că această cifră este în realitate mult mai mică, deoarece există restricții în recombinarea lanțurilor, nu orice lanț L putîndu-se combina cu orice lanț H. În plus, numai cîteva dintre cele 40 de poziții în care s-au găsit variații pot fi implicate în situsul de combinare (cel mult 6). Oricum, numărul tipurilor de imunoglobuline cu o structură primară diferită care pot exista într-un organism este mai mare de 10^6, cifră care reprezintă numărul maxim suficient pentru a acoperi repertoriul tuturor determinanților antigenici cunoscuți.

În concluzie, într-un organism există un număr atît de mare de imunoglobuline cu o structură primară variabilă în situsul de combinare, încît orice determinant antigenic oferit sub o formă

Scanned with OKEN Scanner

acceptabilă pentru organism își va găsi replica sa într-un anticorp cu o specificitate dată. Să subliniem că acest fel de eterogenitate este tipic imunoglobulinelor și că nu a fost găsit pînă acum, din fericire, la nici o altă proteină!

În aceste condiții, organismul trebuie să aibă cel puțin 50 000 de gene care să codifice pentru toate aceste imunoglobuline, și ele să existe în celule încă de la nașterea organismului. Această posibilitate nu a fost agreată de geneticieni, deși doar 10% din cantitatea de ADN care se găsește într-o celulă este suficientă pentru codificarea a 300 000 de tipuri de imunoglobuline. Burnet și-a revizuit sub acest aspect teoria, introducînd în 1964 presupunerea suplimentară că numărul mare de celule cu receptori specifici nu apare la naștere, ci rezultă în urma unor mutații somatice rapide, întîmplătoare, care afectează celulele de la nivelul organelor formatoare de anticorpi. Să precizăm că prin mutații somatice se înțeleg acele modificări ale aparatului genetic la care sînt supuse alte celule decît cele sexuale și care survin în timpul vieții acestora. Prin urmare, aceste mutații întîmplătoare afectează astfel aparatul genetic al celulelor, încît ele, ca și descendenții lor, vor produce anticorpi cu cele mai variate specificități întîmplătoare. Cum se presupune că mutațiile sînt rapide, în organism se formează continuu un număr atît de mare de specificități întîmplătoare, încît se acoperă tot repertoriul determinanților antigenici posibili. Antigenul se combină cu celula mutant care „se întîmplă" să sintetizeze anticorpul complementar și o stabilizează în sensul că ea nu mai

Scanned with OKEN Scanner

poate suferi alte mutații și va produce numai forma omologă de anticorpi. Această presupunere suplimentară, care în aparență încurcă lucrurile, le simplifică totuși în sensul că producerea celor 50 000 de specificități de anticorpi poate fi codificată numai de puține gene și că variațiile rezultă în urma unor mutații la nivelul lor. Deci, nu mai este necesar să se susțină că la nivelul ADN-ului preexistă secvențe nucleotidice care codifică toate specificitățile posibile ale anticorpilor. Se reproșează teoriei selecției clonale că fenomenul de hipermutabilitate somatică presupus a construi *specificitățile preexistente*[1] ale anticorpilor nu are precedent în lumea vie. Reproșul are, desigur, greutate, dar nu trebuie să se uite că nici eterogenitatea anticorpilor nu are precedent în lumea proteinelor și, cu toate acestea, ea există!

Toleranța și autorecunoașterea

Unul din primele succese ale teoriei selecției clonale a fost explicarea fenomenului de toleranță imunologică și autorecunoaștere, fenomene care apăreau enigmatice și de neexplicat pentru teoriile în vigoare atunci. Dar să ne oprim o clipă la aceste două fenomene și să le explicăm.

Se știe că grefele de piele și de organe nu reușesc decît între gemeni univitelini sau în inte-

---

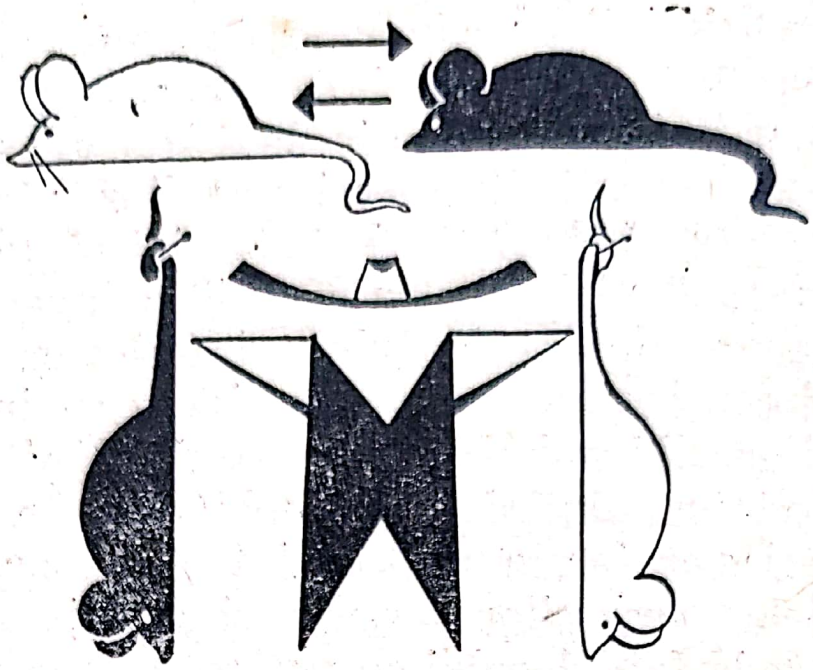
[1] Reamintim că prin specificitățile preexistente ale anticorpilor se înțelege faptul că într-un organism există gata formate, înaintea oricărui contact cu antigenul, cel puțin 50 000 de feluri de molecule, fiecare avînd specificitatea sa înscrisă în situsul de combinare.

Scanned with OKEN Scanner

riorul unei linii consanguine de animale. Acest lucru a fost observat și de imunologul englez Medawar în încercările sale de a transplanta pielea de pe șoarecii albi pe cei cenușii și viceversa. Se constata că după 2—3 săptămîni șoarecii albi „respingeau" pielea celor cenușii și invers. Respingerea se datora faptului că pielea șoarecilor cenușii conține un antigen specific, care în pielea șoarecilor albi există într-o formă diferită (vezi specificitatea alotipică, capitolul V). În consecință, ei vor forma anticorpi față de antigenul din pielea șoarecilor cenușii, și aceștia, combinîndu-se la fața locului cu antigenul, vor povoca distrugerea țesutului și pierderea grefei (pielea se necrozează și cade).

Dacă șoarecii albi erau injectați în timp ce se găseau în uter, sau chiar în primele zile de la naștere, cu celule de splină obținute de la fetuși de șoareci cenușii, se putea constata că în timpul vieții lor următoare ei acceptau și rețineau grefele de la șoarecii cenușii. Acesta este fenomenul de toleranță imunologică. La scurt timp după experiențele lui Medawar s-a arătat că fenomenul de toleranță nu se reduce numai la celule, ci poate fi stabilit față de orice antigen proteic, cu condiția ca acesta să nu aibă o structură chimică mult diferită de cea a proteinelor animalului la care se induce toleranța. De exemplu, injectînd iepurilor nou-născuți o cantitate suficientă de albumină serică umană și repetînd tratamentul de cîteva ori în cursul perioadei postnatale, se constată că animalele ajunse la

Scanned with OKEN Scanner



Anticorpii și grefele

maturitate nu mai pot face anticorpi anti-albumină serică umană dacă li se injectează această proteină.

S-a stabilit că animalele se mențin în stare de toleranță imunologică atît timp cît în organismul lor persistă cantități mici din materialul față de care s-a indus toleranța (celule, proteine). Momentul în care cantitatea de antigen scade sub o anumită limită poate coincide cu momentul terminării toleranței, astfel că, injectînd o cantitate de antigen, acesta să determine apariția anticorpilor.

Autorecunoașterea este proprietatea pe care o au organismele vii de a nu forma anticorpi față de propriile lor componente; ea poate fi exprimată ca o stare de toleranță a organismului față de antigenele proprii (autoantigene) (vezi capitolele 5 și 12).

Scanned with OKEN Scanner

Teoria selecției clonale consideră că autorecunoașterea este determinată de faptul că autoantigenele, prezente într-o cantitate mare în organism, vin în contact în primele perioade ale dezvoltării embrionului cu celulele care conțin receptorii complementari și le distrug. Distrugerea celulelor, în loc de stimularea lor — așa cum se întîmplă în organismul matur —, se petrece datorită faptului că celulele limfoide sînt încă imature. În această perioadă singurul organ limfoid cu o structură bine organizată este timusul, așa că este probabil ca procesul de distrugere să aibă loc la nivelul acestui organ. Cum timusul asigură colonizarea celorlalte organe limfoide în cursul maturizării organismului (vezi capitolul 8), rezultă că el nu va putea trimite celulele care au fost inactivate în urma unui contact timpuriu cu autoantigenele. Eliminarea celulelor capabile de a fi stimulate de autoantigene în cursul vieții embrionare este mecanismul care face ca un organism să nu se imunizeze față de propriile sale antigene.

Toleranța imunologică nu este decît o variantă „artificială" a aceluiași fenomen. Introducînd un antigen oarecare într-un organism la începutul dezvoltării sale, celulele din timus care au receptori cu o structură complementară se vor combina cu antigenul și vor fi astfel blocate. În consecință, cu acest antigen nu se va mai putea imuniza animalul nici atunci cînd sistemul lui imunologic s-a maturizat deoarece celulele cap de clonă sînt „închise" de către antigen. Această modalitate de blocare a celulelor cap de clonă poate fi realizată dacă se administrează animalului *matur* o

Scanned with OKEN Scanner

cantitate foarte mare de antigen. Așa cum am spus în capitolul precedent, în acest caz se realizează o paralizie imunologică al cărei mecanism poate fi asemănător, dacă nu chiar identic, cu cel al toleranței. Acest fenomen arată că eliminarea clonei și stabilirea areacțivității poate fi realizată nu numai la nivelul timusului, ci și al celorlalte organe limfoide, știut fiind că la animalele mature *timusul nu mai funcționează*. Deoarece paralizia imunologică pare a fi determinată de depășirea capacității de prelucrare a macrofagelor și ajungerea la nivelul celulelor imunocompetente a unui exces de antigen *neprelucrat*, se poate presupune că la animalele tinere toleranța imunologică are același mecanism, numai că aici nu nivelul antigenului este prea ridicat, ci capacitatea de prelucrare a macrofagelor este scăzută. Deoarece capacitatea de pinocitare a macrofagelor de la animale tolerante este identică cu cea a animalelor reactive, rezultă că diferența în capacitatea de prelucrare a antigenului de către macrofage se reduce, cel puțin pentru proteine, la echipamentul lor enzimatic. Într-adevăr, s-a constatat că activitatea catepsinelor în celulele obținute de la animale tinere este semnificativ mai scăzută decît cea a animalelor mature. Această diferență de activitate s-ar putea manifesta printr-o capacitate mult mai redusă a animalelor tinere de a prelucra antigenul, deci printr-o sensibilitate mai mare a lor la un tratament care să le inducă o stare de areactivitate imunologică.

Afirmația că în urma contactului „in utero" cu un antigen oarecare celulele se distrug este prea categorică, așa că este preferabil să se con-

Scanned with OKEN Scanner

sidere doar că ele sînt numai blocate, devenind „mute". Această precauțiune trebuie luată, deoarece există *bolile autoimune* ... Aceste boli nu sînt altceva decît o formă de manifestare a unei reacții dintre anticorpi și autoantigene. Iată deci că în anumite condiții autoantigenele pot impresiona propriul lor organism, determinînd un răspuns în anticorpi dirijat împotriva lor însele. Apariția bolilor autoimune arată că, în urma contactului timpuriu cu antigenele proprii, celulele cu receptori complementari nu se distrug, ci doar sînt reduse la ... tăcere. În anumite condiții, această tăcere poate fi ruptă și celulele sînt chemate la sinteză specifică (vezi capitolul 12). Așa cum am spus mai înainte, un factor important care asigură blocarea continuă a acestor celule este persistența la nivelul lor a unei cantități mici, dar suficiente, de autoantigene.

Ideea lui Ehrlich asupra mecanismului formării anticorpilor a fost genială. Poate tocmai de aceea ea a fost prea repede îmbrățișată și tot atît de iute abandonată. Adevărul este că ea n-a fost înțeleasă cum trebuie decît atunci cînd progresele biologiei și biochimiei au permis ridicarea ei pe treapta, astăzi cea mai înaltă, aceea a teoriei selecției clonale. Lipsa de înțelegere a contemporanilor săi este neplăcut ilustrată de cuvintele pe care Bordet le scria despre teoria lui Ehrlich în celebrul său *Tratat de imunologie*, apărut la Paris în 1939: „Teoria lui Ehrlich a exercitat o influență destul de supărătoare, generînd o serie de concepții artificiale relative, mai ales la constituția și clasificarea anticorpilor, la mecanismul de fixare al complementului etc.

Scanned with OKEN Scanner

Prin abuzul de reprezentări grafice care reproduceau aspectul exterior al fenomenelor, fără a pătrunde în intimitatea lor, teoria a răspîndit gustul pentru explicații facile și premature".

Teoria matriței

„Este evident că descoperirile importante din ultimii ani au avut o mare influență asupra ideilor noastre despre formarea anticorpilor. Aș vrea să le descriu cît mai obiectiv posibil. Totuși, poate că am mers prea departe în această direcție cînd am spus în rezumatul meu că teoria selecției este acum mai atrăgătoare pentru mine decît a fost vreodată înainte; căci unii dintre prietenii mei prezenți la această întîlnire m-au implorat să nu abandonez complet ideea matriței". Cu aceste cuvinte își începe imunochimistul american Haurowitz comunicarea sa dedicată evoluției teoriilor despre formarea anticorpilor, în anul 1967, în fața elitei imunologilor din lumea întreagă.

Teoria matriței *(template theory)* a fost suverană în imunologie aproape 30 de ani, adică între 1930 și 1960. Ea a fost elaborată aproape concomitent și independent de trei cercetători, dintre care se distinge indiscutabil figura lui Haurowitz. Teoria sa și-a cucerit repede consimțămîntul general, fiindcă putea explica de ce un organism formează anticorpi față de cele mai variate substanțe organice luate din laboratoarele chimiștilor și nu din cele ale naturii. Haurowitz a presupus că o celulă formatoare de anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpi este capabilă să fabrice multe tipuri diferite de anticorpi (celulă pluripotențială) și că antigenul administrat interferează *direct* cu mecanismul de sinteză al imunoglobulinelor, modificînd acest proces, astfel că în moleculele nou formate se imprimă un situs de combinare complementar. Antigenul perturbă sinteza de imunoglobuline în momentul în care are loc asamblarea aminoacizilor, determinînd fixarea lor în poziții neobișnuite și deci combinarea unul cu altul într-o manieră anormală, astfel că se formează o globulină cu structura specifică anticorpilor în loc de o globulină normală. Deci antigenul „instruiește" celula cum să producă o proteină cu o structură complementară grupărilor sale determinante. De aceea, teoria lui Haurowitz mai este cunoscută și sub numele de *„teoria instrucționistă"*.

După 10 ani de la enunțarea ei, teoria a fost „revăzută și adăugită" de Pauling. El a presupus că toate moleculele de anticorpi produse într-un organism au o structură primară identică (deci aceeași secvență a aminoacizilor) și diferă unele de altele numai prin conformația lanțurilor peptidice. După Pauling, legătura reciprocă strînsă dintre antigen și anticorp se realizează printr-o pliere (încolăcire) a capetelor lanțului polipeptidic pe suprafața antigenului. Astfel, o grupare antigenică se imprimă ca un sigiliu în cele două capete ale lanțului polipeptidic, lăsînd două „urme" care nu sînt altceva decît cele două situsuri de combinare. Schemele lui Pauling n-au lipsit din nici o carte de imunologie și a trebuit să se arate, fără nici un fel de dubiu, că anticorpii cu speci-

Scanned with OKEN Scanner

ficitate diferită au și o structură primară diferită, pentru ca aceste simpatice reprezentări să înceapă să treacă în domeniul trecutului. Punctul de vedere avansat de Pauling a putut supraviețui deci numai atît timp cît nu se știa nimic despre strînsa corelație care există între structura primară și conformația spațială a proteinelor (vezi capitolul 2). Astăzi este demonstrat că conformația moleculelor de anticorpi, în general, și conformația situsurilor lor de combinare, în special, sînt determinate de secvența aminoacizilor [1].

De aceea, în anul 1965 Haurowitz a făcut o încercare de a reconcilia ideea acțiunii de matriță

---

[1] Concepția lui Pauling că anticorpii nu sînt altceva decît niște gamma-globuline cu configurația modificată de către antigen a condus la unele experiențe de preparare a anticorpilor „in vitro", care au început bine, dar s-au terminat rău. Astfel, în 1942, Pauling a reușit să prepare anticorpi sintetici față de azofenilarsonat, dar 4 ani mai tîrziu Haurowitz n-a reușit să reproducă experiențele, pentru ca în 1953 să se arate că ele erau greșite. Ca o curiozitate, să notăm că această cale, în ciuda faptului că se opune concepțiilor actuale, mai tentează pe unii cercetători. Acum cîțiva ani s-a semnalat că se pot obține în eprubetă anticorpi antihaptenă. Această afirmație a fost privită cu indiferență și nimeni (în afara autorilor ei) n-a mai dorit s-o repete.

Să punem punct la această problemă într-un mod literar: Sinclair Lewis, în romanul său *Martin Arrowsmith* apărut în 1925, face o anticipație: severul profesor Gottlieb, unul dintre cele mai fantastice personaje ale cărții, face o descoperire. O reproducem după carte: „În anul acela, după 20 de ani de cercetări, Gottlieb reuși să-și desăvîrșească capodopera. Izbuti să producă antitoxine în eprubetă, ceea ce însemna că va fi posibil să se imunizeze oamenii împotriva anumitor boli, fără a mai recurge la procedeul complicat de a face serul prin inocularea animalelor. Dacă nu se înșelase, ceasta const ituia o revoluție, o revoluție în imunologie".

Scanned with OKEN Scanner

a antigenului cu concepţiile moderne asupra intervenţiei acizilor nucleici în biosinteza proteinelor. Haurowitz presupune că antigenul interferează sinteza imunoglobulinelor în faza de traducere, adică în faza în care se asamblează aminoacizii în lanţul polipeptidic ce se formează la nivelul ribozomilor sub îndrumarea ARN-ului mesager. Această presupunere reprezintă o extindere a unor cercetări care au arătat că conformaţia, deci şi structura primară a unui lanţ polipeptidic în formare, poate fi modificată într-o măsură oarecare în cursul fazei de traducere a mesajului. Schema pe care o prezintă Haurowitz arată modul în care interferează determinanţii antigenici cu lanţurile polipeptidice H şi (sau) L în cursul sintezei lor (vezi figura 15).

În schemă se arată conturul unui ribozom cu un ARN mesager ataşat de el, care consistă din codonii 1, 2, 3 ... Pe aceştia se aşază anticodonii complexelor tARN-aminoacizi avînd acelaşi număr şi astfel determină legarea aminoacizilor 1, 2 şi 3 unul de celălalt (vezi capitolul 2). Determinantul antigenic, prin intermediul grupării sale polare, forţează lanţul peptidic ce creşte să adere de el şi astfel să formeze un situs de combinare complementar în molecula anticorpului în curs de formare. Complexele tARN-aminoacizi 4, 5 şi 6 sînt eliminate, deoarece resturile lor de aminoacizi nu sînt capabile să se plieze, astfel ca să se formeze o suprafaţă complementară în lanţul polipeptidic în curs de formare. De aceea, în locul aminoacizilor 4, 5 şi 6 se încorporează aminoacizii care se pot plia complementar x, y şi z din complexele tARN-aminoacizi respective. Apoi, ARN-ul

Scanned with OKEN Scanner

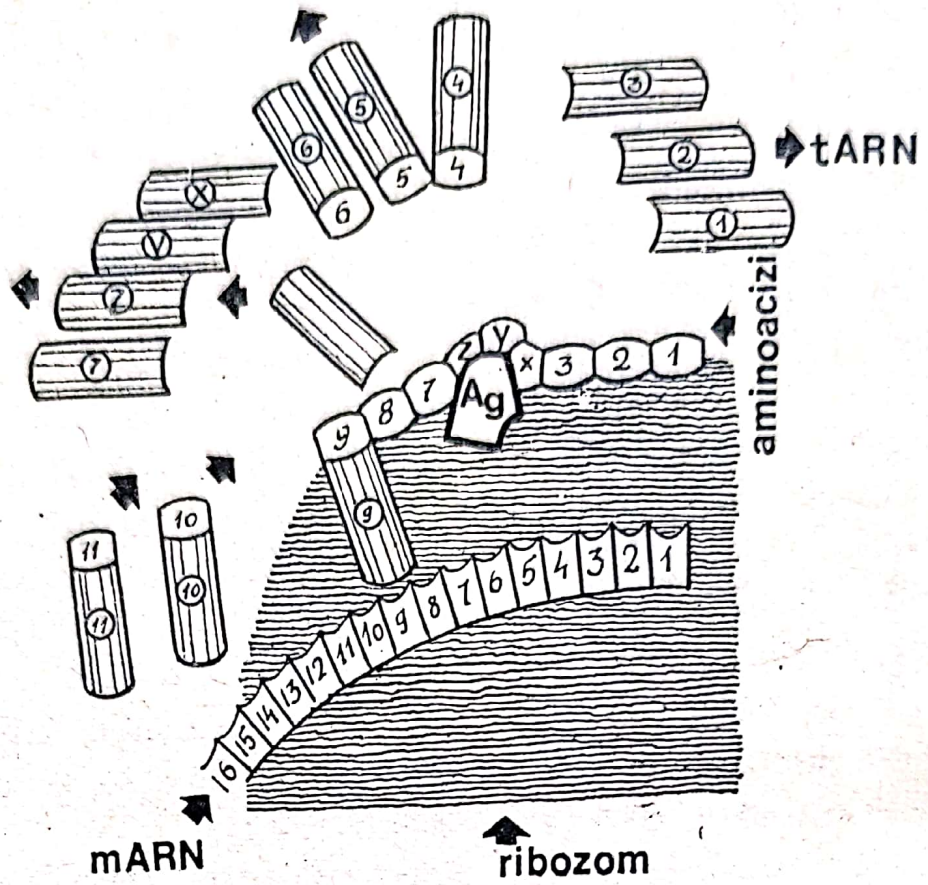


Fig. 15 — Cum vede teoria matriței modul de sinteză al anticorpilor la nivelul ribozomului

mesager continuă traducerea codului său nucleotidic în secvența aminoacizilor și se încorporează resturile de aminoacizi „normale" 7, 8, 9 ș.a.m.d. Diagrama nu restrînge acțiunea fragmentului antigenic numai asupra cîtorva aminoacizi adiacenți dintr-un singur loc, ci el poate să acționeze în două sau chiar mai multe locuri dintr-o „buclă" a lanțului polipeptidic.

Conform teoriei lui Haurowitz, antigenul sau fragmentele sale trebuie să fie *permanent* prezente la nivelul ribozomilor pentru a asigura producerea continuă a anticorpilor. Or, cum bine se știe, antigenul sau fragmentele sale chiar foarte puternic marcate cu izotopi radioactivi n-au putut

Scanned with OKEN Scanner

fi găsite în celulele plasmatice. De aceea, chiar Haurowitz consideră că acțiunea directă a determinanților antigenici este puțin probabilă. Să ne reamintim — pentru contrast — că teoria selecției clonale nu cere ca antigenul să fie prezent în celula care face anticorpi, ci numai să „ciocnească" celula cap de clonă care apoi se va divide continuu și va sintetiza imunoglobulina sa specifică în fabricile descendenților săi. Descendenții moștenesc de la părinți ordinul de sinteză, însă el se execută de la generație la generație de celule din ce în ce mai prost. Astfel s-a constatat că producerea anticorpilor de către celule expuse la antigen și apoi transferate prin cîteva organisme gazdă are tendința să scadă, așa că la al patrulea transfer sinteza se oprește. Este suficient însă să incubăm aceste celule cu antigen pentru ca sinteza de anticorpi să se conecteze din nou.

Această experiență ridică din nou întrebarea: este antigenul necesar numai pentru inițierea formării anticorpilor sau prezența lui este trebuincioasă și pentru continuarea sintezei de anticorpi atît în celulele expuse la antigen cît și în celulele lor fiice?

Această întrebare, ca și altele pe care nu le-am mai amintit, este pusă tot mai insistent teoriei selecției clonale de către acei cercetători care obțin rezultate ce nu se „supun" teoriei. Pentru a le explica, Burnet și numeroșii săi adepți au recurs la adăugiri suplimentare (așa a fost, de exemplu, ideea hipermutabilității celulei somatice). Dar cînd o teorie recurge la completări pentru a explica cutare sau cutare fenomen disparat, este, credem noi, un semn discret de îmbă-

Scanned with OKEN Scanner

trînire. Care este atunci *adevărul* despre felul în care se formează anticorpii într-o celulă? Răspunde cel mai îndreptățit dintre contemporanii noștri, Burnet: „Trebuie să vă reamintesc că *adevărul științific* poate fi definit ca un mănunchi de fapte și generalizări provizorii care (...) nu au fost încă dovedite a fi greșite“ (!).

Scanned with OKEN Scanner

10

În care se prezintă unirea anticorpului cu antigenul și cum este folosită ea în laboratoare

Combinarea anticorpului cu antigenul nu înseamnă altceva decît punerea într-un contact strîns a grupărilor determinante de pe suprafața antigenului cu situsurile de combinare de pe suprafața anticorpului. Grupările determinante apar ca niște proeminențe pe suprafața antigenului, în timp ce cele două situsuri de combinare apar ca niște adînciturі (crevase) la cele două capete ale moleculei anticorpului (vezi figura 5). Combinarea lor este deci determinată de complementaritatea reciprocă (congruența) dintre conturul determinanților antigenici și situsul de combinare. Pe această potrivire, care amintește pe cea dintre un sigiliu (grupare determinantă) și ceara în care își lasă urma (situsul de combinare) se bazează specificitatea imunologică.

Scanned with OKEN Scanner

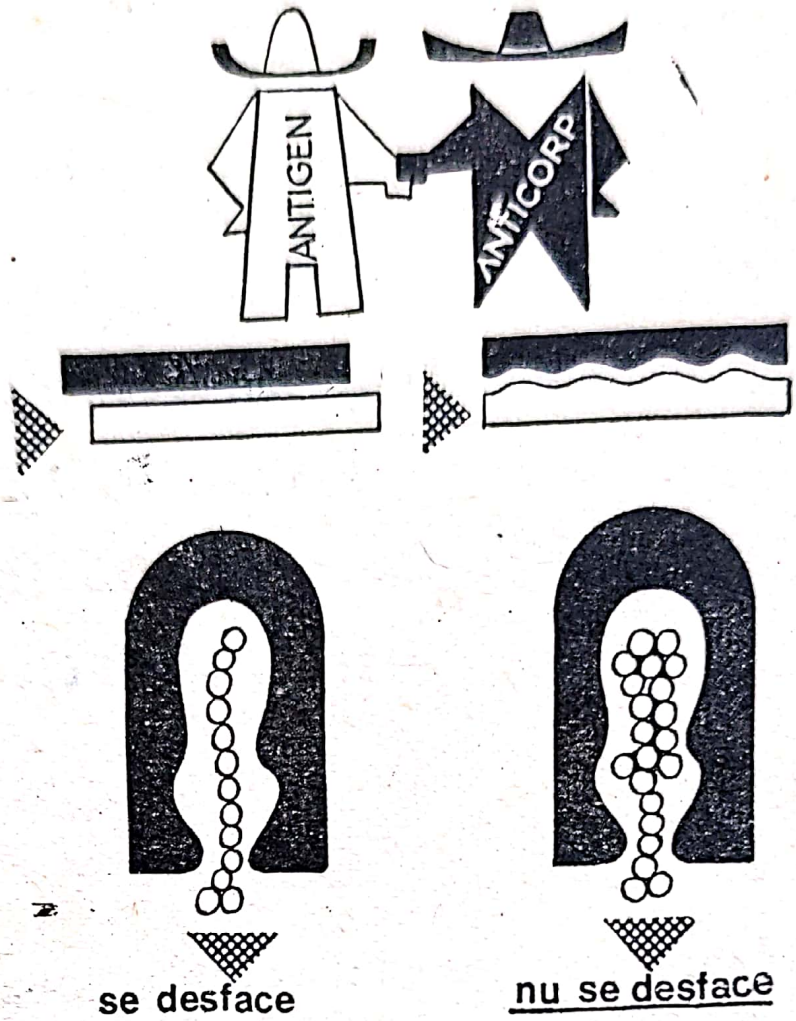


Fig. 16 — Potrivirea dintre gruparea determinantă și situsul de combinare

Rolul important pe care complementaritatea îl joacă în atracția reciprocă dintre cei doi parteneri și formarea complexului imun poate fi ilustrat printr-o analogie. Să luăm două scînduri și să le lipim una de cealaltă printr-un liant oarecare. Dacă vom încerca să dezlipim cele două scînduri prin alunecarea lor una peste cealaltă, vom constata că la o presiune dată bucățile se desfac. Dar vom transpira mult și bine fără să reușim să le desfacem, dacă în cele două scînduri am săpat un contur complementar (figura 16). Potri-

Scanned with OKEN Scanner

virea structurală asigurată în acest caz, ca și în acela al antigenului și anticorpului, asigură contractarea unor forțe de legare solide, care duc la formarea unor complexe stabile în timp.

Potrivirea strînsă dintre grupări le aduce la o apropiere de 1—2 Å (1 Å = 10^{-8} cm = a sutamilioana parte dintr-un centimetru), ceea ce permite ca între suprafețele lor să se stabilească forțe intermoleculare foarte eficiente la această distanță mică. Între suprafețele grupărilor determinante și ale situsurilor de combinare se stabilesc *legături de hidrogen* datorită prezenței grupărilor donatoare de hidrogen (amino și hidroxil) și a celor primitoare de hidrogen (carboxil) din aminoacizii prezenți aici. Se realizează, de asemenea, *interacțiuni hidrofobe*, datorită prezenței unor grupări nepolare existente în aminoacizi ca leucina, izoleucina și fenilalanina. Interacțiunile hidrofobe conduc la aderarea grupărilor nepolare dintre cele două regiuni active, care vin astfel în contact și determină „stoarcerea" — eliminarea — apei din vecinătatea imediată a grupărilor nepolare. Atracția dintre grupările nepolare ale determinantului antigenic și cele ale situsurilor de combinare este realizată prin *forțe Van der Waals*. Identificarea peptidelor nepolare în situsul de combinare al anticorpilor, ca și experiențe surprinzătoare care au arătat că interacțiuni hidrofobe se petrec chiar și la reacții cu antigene polizaharidice (considerate parteneri ideali pentru stabilirea legăturilor de hidrogen) ne permit să afirmăm că interacțiunile hidrofobe sînt principalele forțe intermoleculare care duc la formarea complexelor imune. Între antigen și anticorp se

Scanned with OKEN Scanner

pot exercita și *interacțiuni electrice* rezultate din *atracția coulombiană* dintre grupările încărcate ale antigenului și cele complementare, dar de semn contrar, ale anticorpului. Aceste forțe se manifestă numai cînd gruparea determinantă a antigenului este încărcată electric; grupările încărcate electric din situsul de combinare al anticorpilor se limitează la cele carboxilice, încărcate negativ, dacă determinantul antigenic este pozitiv, și la grupările aminice (lizină, arginină, histidină) dacă determinantul antigenic este negativ. Rezultă că în situsul de combinare pot exista configurații electrice limitate, care vor servi la atracția determinanților antigenici încărcați pozitiv sau negativ, indiferent de faptul că ei se găsesc pe aminoacizii ce există în mod natural în proteină sau pe haptenele introduse artificial pe suporturi proteice.

Forțele de atracție dintre antigen și anticorp sînt surprinzător de slabe (5—15 kilocalorii/mol) în comparație cu forțele puternice (de ordinul 50—100 kilocalorii/mol) care se manifestă în legăturile chimice obișnuite. Ar fi greu de înțeles cum pot aceste forțe neînsemnate să mențină unite componente atît de voluminoase, cum sînt antigenul și anticorpul, dacă n-ar exista configurația spațială complementară a celor doi parteneri. Această configurație aduce într-o strînsă apropiere numeroși atomi și grupuri de atomi între care, deși se stabilesc legături slabe, ele sînt suficient de numeroase pentru a asigura trăinicia complexului antigen-anticorp.

Tăria legăturii antigen-anticorp depinde deci nu numai de tipul forțelor intermoleculare care

Scanned with OKEN Scanner

acționează, ci și de mărimea suprafeței puse în contact. Este evident că o suprafață mai mare va permite stabilirea unui număr mai mare de legături de orice fel decît o suprafață mai mică.

Suprafața pusă în comun de antigen și anticorp depinde de mărimea grupării determinante. A afla mărimea determinanților antigenici înseamnă, implicit, a afla mărimea situsului de combinare. Am amintit la capitolul consacrat structurii anticorpilor că fibroina din mătase pare a avea o grupare determinantă alcătuită din 12 aminoacizi. Această cifră reprezintă cea mai mare dimensiune pe care o poate avea o grupare determinantă. Experințe cu polizaharide și polipeptide sintetice au arătat că o grupare determinantă pare a fi alcătuită din 5—6 aminoacizi și din cam tot atîtea monozaharide, dacă este vorba de un antigen polizaharidic. S-a putut calcula că suprafața unei grupări determinante mari, cum este cea formată din 5—6 molecule de lizină, este de 2 500 $Å^2$. Rezultă deci că mărimea situsului de combinare trebuie să fie asemănătoare și că suprafața de contact dintre cei doi parteneri este de maximum 5 000 $Å^2$. Raportată la întreaga suprafață a anticorpilor de tip IgG (50 000 $Å^2$), se poate calcula cu ușurință că aria situsului de combinare nu reprezintă decît 5% din suprafața întregii molecule.

Ce procent din suprafața antigenului ocupă o grupare determinantă cu o arie de 2 500 $Å^2$? La această întrebare nu se poate răspunde decît cunoscînd dimensiunile moleculei de antigen și numărul de grupări determinante de acest fel pe care le conține. Pentru albumina serică acest pro-

Scanned with OKEN Scanner

cent este ceva mai mic de 20%. Specificitatea combinării antigenului cu anticorpul reprezintă deci posibilitatea de a pune în comun două porțiuni relativ mici din suprafața lor totală, dar a căror potrivire structurală reclamă perfecțiunea. De aici și specificitatea ridicată a reacției, care face ca un anticorp să se combine numai cu determinantul antigenic care i-a provocat apariția și nu cu altul, chiar dacă structura acestuia din urmă nu este decît neînsemnat modificată (vezi și capitolul 5).

Reacția dintre antigen și anticorp se manifestă în eprubetă sub atît de multe chipuri, încît enumerarea lor ar lua o pagină întreagă. Formele de manifestare ale acestei uniuni depind în primul rînd de natura antigenului. Dacă antigenul este o proteină sau un polizaharid, atunci contactul său cu anticorpul corespondent va putea duce la o *precipitare*. Dacă antigenul este o hematie, un microorganism sau o celulă, contactul cu anticorpii specifici va determina *aglutinarea* lor. Să ne rezumăm numai la aceste două reacții fundamentale.

Reacția de precipitare

În mai multe eprubete introducem cantități din ce în ce mai mari de ovalbumină, dizolvate în același volum de soluție salină fiziologică [1] (figura 17). În fiecare eprubetă se adaugă acum

[1] Soluția conține 0,9 g NaCl la 1 litru de apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

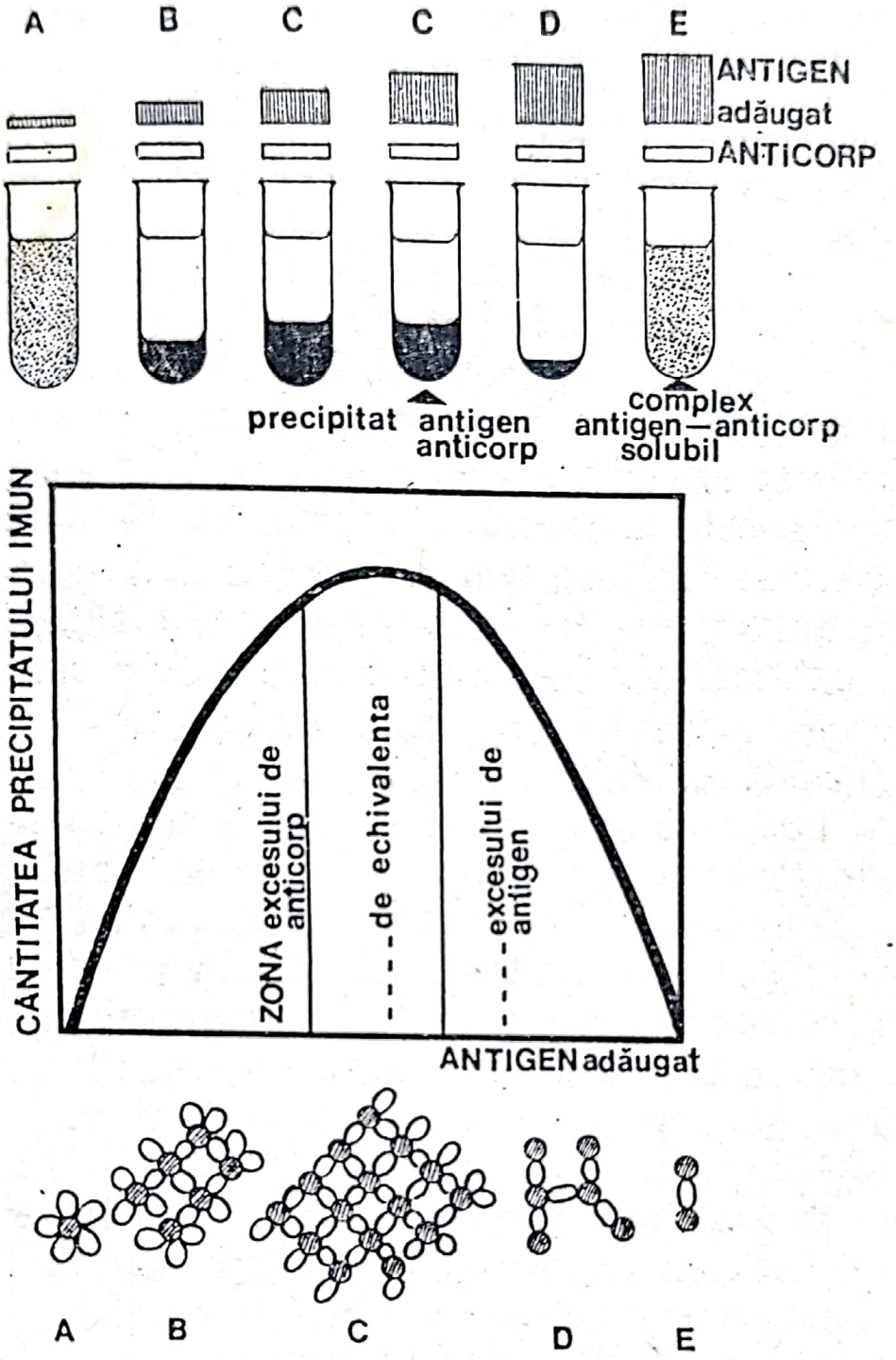


Fig. 17 — Reacția de precipitare dintre antigen și anticorp

A. Exces mare de anticorpi, toate cele 5 valențe ale antigenului (ovalbumina) fiind satisfăcute (complex solubil); B. exces moderat de anticorpi (precipitare); C. proporție optimă (cea mai mare cantitate de precipitat); D. exces de antigen (precipitare); E. exces mare de antigen cu ambele valențe ale anticorpului satisfăcute (complex solubil).

Scanned with OKEN Scanner

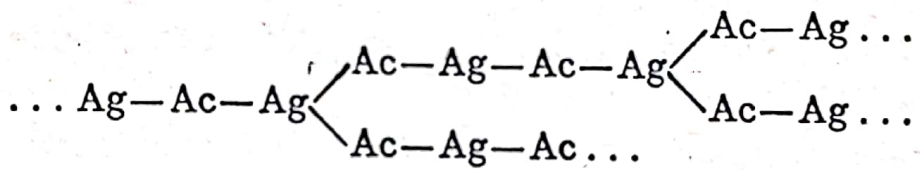
un volum fix din serul unui iepure imunizat față de ovalbumină. Scuturăm eprubetele pentru a amesteca conținutul lor și apoi le ținem o jumătate de oră la 37°C. Examinînd eprubetele, constatăm o precipitare foarte slabă în eprubetele unde există un exces mare fie de anticorpi (eprubetele de la început), fie de antigen (eprubetele de la sfîrșit). Precipitate abundente se găsesc în eprubetele de la mijloc, în care proporția dintre antigen și anticorpi a fost mai echilibrată; precipitarea este maximă în eprubeta în care s-a realizat un raport optim între cei doi reactanți. Acest maxim se numește *zonă de echivalență*, după cum extremitățile se numesc *zona excesului de anticorpi*, respectiv *zona excesului de antigen*.

Această experiență arată că reacția de precipitare poate să aibă loc numai în anumite raporturi între anticorp și antigen și deci cantitatea de complex imun *insolubil* formată depinde de acest raport. Considerînd reacția ca o adsorbție a anticorpului pe suprafața antigenului și aplicînd ecuațiile clasice de adsorbție, Heidelberger a reușit să exprime reacția de precipitare într-o formulă matematică de felul: $Q = ax - bx^2$, în care Q = cantitatea de anticorpi precipitată, x = cantitatea de antigen adăugată, iar a și b sînt două constante care se determină prin calcul.

Pentru a explica cum se formează complexul imun insolubil, imunologul englez Marrack a emis, în 1934, o teorie care, în forma completată de Pauling în 1940, este în vigoare și astăzi, fiind cunoscută sub numele de *teoria rețelei*. Ea se bazează pe două fapte: anticorpii au două situsuri de combinare (deci sînt bivalenți), iar anti-

Scanned with OKEN Scanner

genele, pentru a putea fi precipitate, trebuie să aibă cel puțin două grupări determinante identice (vezi capitolul 5). Este clar că un anticorp bivalent nu se poate uni decît cu două molecule de antigen, dacă acesta are o singură grupare determinantă; complexul astfel format nu are dimensiuni suficient de mari pentru a deveni insolubil și a precipita. Dacă antigenul este bivalent, se pot forma lanțuri alungite, în care moleculele antigenului și ale anticorpului alternează (Ag-Ac-Ag-Ac-Ag-Ac...) formînd un fel de polimer care este insolubil. Desigur, dacă antigenul are trei sau mai mulți determinanți identici, se pot forma lanțuri ramificate care cresc în dimensiuni rezultînd structuri dense ce se depun sub forma unui precipitat:



Precipitatul antigen-anticorp se formează în cantitate mică sau chiar nu se formează de loc cînd în mediul de reacție există un exces mare de antigen; în acest caz există o competiție mare între antigene pentru cele două situsuri de combinare ale anticorpilor, astfel că un antigen o dată fixat într-un situs de combinare al unui anticorp nu va putea interacționa cu situsul altei molecule de anticorp, în ciuda faptului că posedă mai multe grupări determinante identice. În consecință, se vor forma complexe Ag-Ac-Ag, evident solubile. Dacă anticorpii sînt în exces, atunci va exista o competiție pentru grupările determi-

Scanned with OKEN Scanner

nante ale antigenului, astfel că anticorpii fixați cu un capăt de un antigen nu vor mai „găsi" disponibile pentru celălalt capăt grupări determinante libere de pe alte molecule de antigen. Această situație a fost ilustrată în diagrama din figura 17. Dacă anticorpii sînt desfăcuți prin acțiunea papainei, ei se transformă în două fragmente Fab și un fragment Fc (vezi capitolul 3). Fragmentul Fab nu poartă decît un singur situs de combinare, deci este univalent. Amestecînd fragmentele Fab ale unui anticorp cu antigenul corespondent, nu se obține nici un precipitat, deși cei doi componenți reacționează unul cu celălalt. Această experiență dovedește că pentru formarea rețelei și insolubilizarea complexului imun este nevoie ca moleculele de antigen să fie unite una cu cealaltă prin intermediul unei molecule de anticorp care are două situsuri de combinare în moleculă.

Presupunerea că pe suprafața unei molecule proteice există două sau mai multe grupări determinante identice nu poate fi generalizată, deoarece se știe precis că există proteine care n-au secvențe de aminoacizi care să se repete. Este cazul mioglobinei, despre care am vorbit înainte (capitolul 5). Cum ea nu conține secvențe repetitive, înseamnă că pentru precipitarea ei este necesar să fie prezent un *amestec* de anticorpi față de mai mult de una din grupările determinante. Dacă s-ar produce anticorpi numai față de una din grupările determinante, nu s-ar putea forma un precipitat prin amestecarea mioglobinei cu serul anti-mioglobină. Cum în realitate precipitarea are loc, înseamnă că în acest caz rețeaua

Scanned with OKEN Scanner

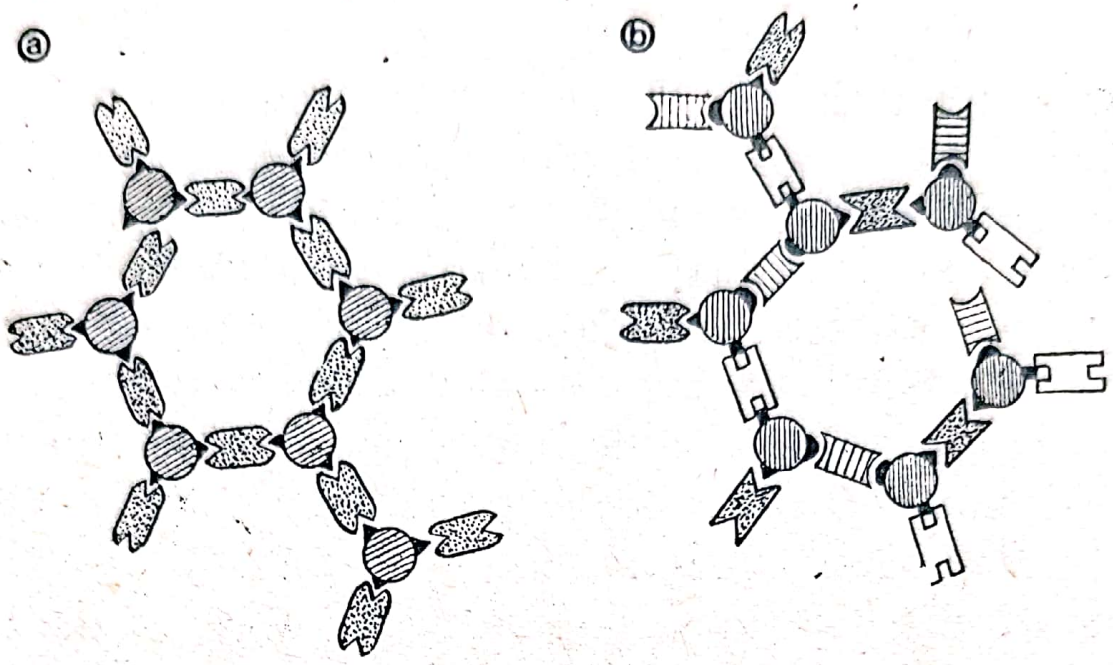


Fig. 18 — Formarea rețelei de precipitare

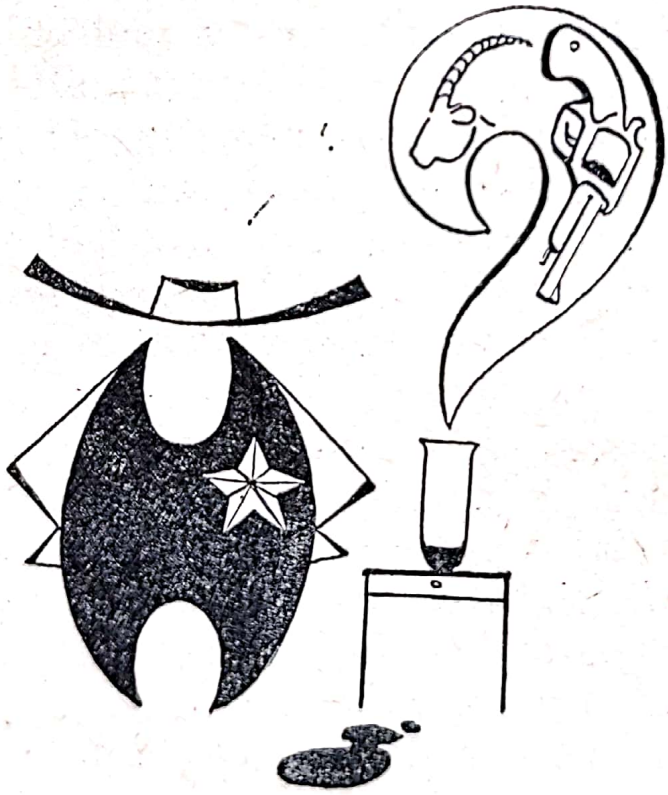
a. Antigen cu 3 grupări determinante identice (rețea omogenă);
b. antigen cu 3 grupări determinante diferite (rețea eterogenă).

necesară precipitării se formează prin reacția grupărilor determinante de pe molecula mioglobinei cu anticorpii ce posedă mai multe specificități. Această situație este schematizată în figura 18. Se relevă dificultatea de a studia sub aspect cantitativ interacțiunea dintre antigene proteice pure și anticorpii corespondenți, ultimii fiind în realitate un amestec de molecule ce posedă *specificități* diferite.

Această situație nu împietează însă cu nimic asupra aplicării metodei de precipitare în practica analizelor serologice. Specificitatea reacției antigen-anticorp face ca prin reacția de precipitare să se poată deosebi un ser provenind de la om de serul obținut de la animale. Prin injectarea unui iepure cu ser de om, el va face anticorpi față de proteinele existente în serul de om și aceștia nu vor reacționa cu proteinele din serul

Scanned with OKEN Scanner

unor animale. De aceea, printr-o simplă reacție de precipitare se poate stabili dacă o pată de sînge lăsată la locul unei presupuse crime este de proveniență umană sau animală. Se procedează astfel: se extrage pata de sînge cu o soluție salină care trece în soluție proteinele serice. Peste ea se adaugă un ser de iepure imunizat cu ser de om. Dacă se obține o reacție de precipitare, înseamnă că pata de sînge provenea de la un om. O reacție negativă arată contrariul, iar cu seruri specifice apropiate se poate arăta și de la ce animal provine sîngele : oaie, pasăre, cal etc. Nu poate scăpa cititorului cît de important este acest test în medicina judiciară.



Pata de sînge este de om sau de animal? Răspunsul îl dau anticorpii

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece în serul de iepure imunizat cu ser de om [1] există, teoretic, tot atîtea feluri de anticorpi cîte feluri de proteine imunogenice există în serul de om, este normal ca precipitatele obținute să fie amestecuri eteroclite de tot felul de complexe imune. Pentru a putea deosebi cîte feluri de proteine imunogenice există într-un ser de om, s-a realizat un artificiu de tehnică foarte ingenios, numit *imunodifuzie*. Această realizare aparține, în egală măsură, imunologilor Oudin (din Paris) și Ouchterlony (din Göteborg), ale căror nume sînt tot atît de populare între oamenii de laborator ca și cele ale marilor teoreticieni încărcați de glorie și premii Nobel.

Imunodifuzia nu este altceva decît o reacție de precipitare efectuată într-un mediu gelificat. Adică, se dizolvă la cald puțin agar (polizaharid extras din alge) și se întinde pe o placă de sticlă. Prin răcire, agarul se întărește și rezultă un gel asemănător cu piftia. În acest gel se fac două orificii. Unul se umple cu serul de om, celălalt cu serul de iepure anti-ser de om. Se lasă ca cei doi componenți să difuzeze unul către celălalt. Mișcarea lor amintește lărgirea cercurilor de pe suprafața unei ape în care am aruncat o piatră, viteza moleculelor fiind cu atît mai mare cu cît greutatea lor moleculară este mai mică.

---

[1] Serurile animalelor imunizate se numesc pe scurt antiseruri. Pentru a se preciza specificitatea lor, se scrie: ser de iepure anti-ser de om, sau ser de capră anti-ovalbumină etc.

Scanned with OKEN Scanner

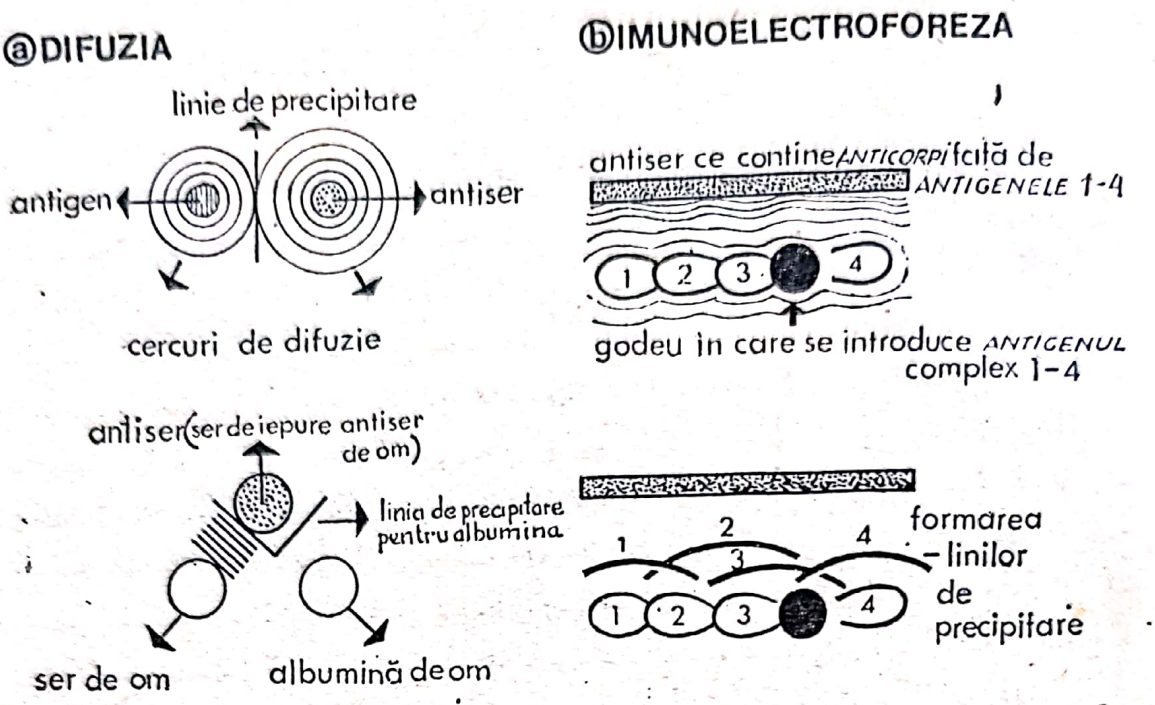


Fig. 19 — Analiza în gel a reacției dintre un amestec de antigene și anticorpii corespondenți

Acolo unde se vor întîlni anticorpii din antiser cu antigenele corespunzătoare din serul de om vor apărea linii de precipitare (vezi figura 19 a). Cîte linii de precipitare se formează, atîtea feluri de proteine avem în serul pe care îl analizăm. De exemplu, în sistemul amintit mai sus se pot forma pînă la 10 linii de precipitare, ceea ce înseamnă că în serul de om există cel puțin 10 feluri de proteine deosebite unele de altele. Am spus *cel puțin*, deoarece este posibil ca două sau mai multe proteine să aibă o viteză de difuzie egală (citește: greutate moleculară egală) și atunci ele se vor întîlni cu anticorpii corespunzători în același loc. Deci într-o linie de precipitare vor putea fi cuprinse mai multe feluri de complexe imune.

Această posibilitate neplăcută l-a necăjit atît de mult pe profesorul francez Pierre Grabar, încît

Scanned with OKEN Scanner

în 1955 el a reușit să o îndepărteze, combinînd imunodifuzia cu electroforeza. Din această combinare s-a născut *metoda imunoelectroforetică*, unul din cele mai puternice instrumente analitice aplicate în biologia de azi. Procedeul este simplu: în gelul de agar se taie un orificiu în care se introduce serul de om. Se trece un curent electric prin placă, adică se face electroforeza serului de om. Proteinele se separă sub formă de pete invizibile în cele cinci fracțiuni electroforetice cunoscute: albumină, alfa$_1$-globulină, alfa$_2$-globulină, beta-globulină și gamma-globulină (vezi capitolul 2). Se oprește curentul electric și se taie în gelul de agar un șanț paralel cu direcția de migrare, așa cum se vede în schema noastră (figura 19 b). El se umple cu serul de iepure anti-ser de om și se așteaptă. Cei doi reactanți difuzează unul către celălalt, se ciocnesc și apar liniile de precipitare. Cu un antiser bun se pot număra mai mult de 25 de linii. Ele sînt așezate pe toată distanța pe care s-au întins la electroforeză proteinele, avînd aspectul unor arcuri de cerc întretăiate. Separarea proteinelor serice în 25 de componente, în locul celor 10 componente obținute prin imunodifuzie, și a celor 5 componente obținute prin electroforeză, arată că imunoelectroforeza este mai mult decît o însumare a celor două metode din a căror contopire s-a născut. Separarea mai avansată pe care o realizează imunoelectroforeza se bazează pe faptul că dacă două proteine au aceeași viteză de difuzie, deci aceeași greutate moleculară, este puțin probabil ca ele să aibă

Scanned with OKEN Scanner

Imunodifuzia sau baia în gel a anticorpilor

și aceeași sarcină electrică, și invers[1]. De aici, puterea mare de separare a metodei. În spectrul imunoelectroforetic al serului de om s-au identificat, pe lîngă liniile corespunzătoare celor 5 tipuri de imunoglobuline (IgG, IgA, IgM, IgD și IgE), și cele ale multor proteine serice, dintre care amintim doar cîteva: *transferina*, *ceruloplasmina*, *haptoglobina*, *lipoproteinele*, *complementul* și, desigur, *albumina*. S-a dovedit astfel că clasificarea proteinelor serice în cele 5 componente electroforetice este pur convențională, fiecare dintre ele fiind alcătuite dintr-un număr mare de individualități proteice care îndeplinesc funcții bine definite în organism.

---

[1] Din 25 de oameni aleși la întîmplare, este mai ușor de găsit cîțiva care au aceeași culoare a părului sau aceeași mărime a capului, dar s-ar putea să nu se găsească nici măcar doi care să aibă în același timp aceeași culoare a părului și aceeași mărime a capului.

Scanned with OKEN Scanner

Aplicarea imunoelectroforezei nu se limitează numai la analizarea serurilor sanguine, ci se extinde asupra tuturor proteinelor, firește cu condiția ca ele să fie antigenice. Nu este de mirare de aceea că imunoelectroforeza este metoda preferată a cercetătorilor care studiază structura antigenică a umorilor, organelor, țesuturilor, celulelor; cu ajutorul ei s-au putut pune în evidență antigene specifice unor organe, țesuturi și celule normale, precum și apariția unor antigene noi în cazuri patologice. Să mai reținem că imunoelectroforeza a fost utilizată la izolarea unor antigene tipice pentru celula canceroasă. Acest fapt ar putea fi trecut cu vederea dacă nu ar exista speranța ca să se obțină anticorpi specifici față de aceste antigene tumorale care să distrugă celula canceroasă și numai celula canceroasă, performanță pe care n-o realizează astăzi nici radioterapia și nici chimioterapia cu citostatice.

Imunodifuzia în gel poate apărea cititorului ca o aplicare foarte simplă a reacției de precipitare. Pentru a-l scoate din păcatul unei judecăți superficiale, să amintim că de la descoperirea reacției de precipitare (1897) și pînă la ideea „simplă" de producere a ei în gel (1946) a trecut aproape o jumătate de secol.

Anticorpi fluorescenți

Tot „banala" reacție de precipitare a prilejuit și inventarea unor instrumente de cercetare care permit localizarea antigenelor în țesuturi, în

Scanned with OKEN Scanner

celule și chiar în interiorul acestora. Cum putem afla ce fel de celule sintetizează proteina X sau în ce parte a celulei este sintetizată sau depozitată ea?

Se procedează astfel: din serul anti-proteină X se scot anticorpii și de aceștia se leagă chimic o substanță fluorescentă *(izotiocianatul de fluoresceină)* sau una opacă (deci vizibilă) la microscopul electronic (de exemplu *feritina*). Anticorpii astfel marcați se pun pe preparatul microscopic pe care vrem să-l cercetăm. Ei se vor combina cu antigenul X și vor „însemna" regiunile unde este distribuit acesta fie printr-o fluorescență vizibilă la microscopul cu ultraviolete, fie prin puncte negre, dacă se folosește microscopul electronic. Cu tehnica anticorpilor fluorescenți se determină care anume celule dintr-un țesut conțin proteina X, iar prin tehnica cu feritină se determină în ce parte a celulei este stocată proteina X (nucleu, mitocondrii, ribozomi etc.). Felul în care se realizează aceste tehnici este schematizat în figura 20 a.

Tehnica de imunofluorescență a fost aplicată în toate domeniile în care microscopul este suveran, servind la diagnostic (cînd antigenul este un microorganism sau un virus) și mai ales în cercetare. Să amintim că imunofluorescența a permis identificarea celulelor care sintetizează anticorpii. Pentru aceasta se folosește o variantă a metodei care poartă numele de tehnica *sandviș* (vezi figura 20 b). În acest caz, preparatul microscopic se tratează întîi cu antigenul X, față de care există în celulă anticorpi. Acesta se combină cu anticorpii, păstrînd totodată și cîteva grupări determinante libere. În faza următoare, se adaugă

Scanned with OKEN Scanner

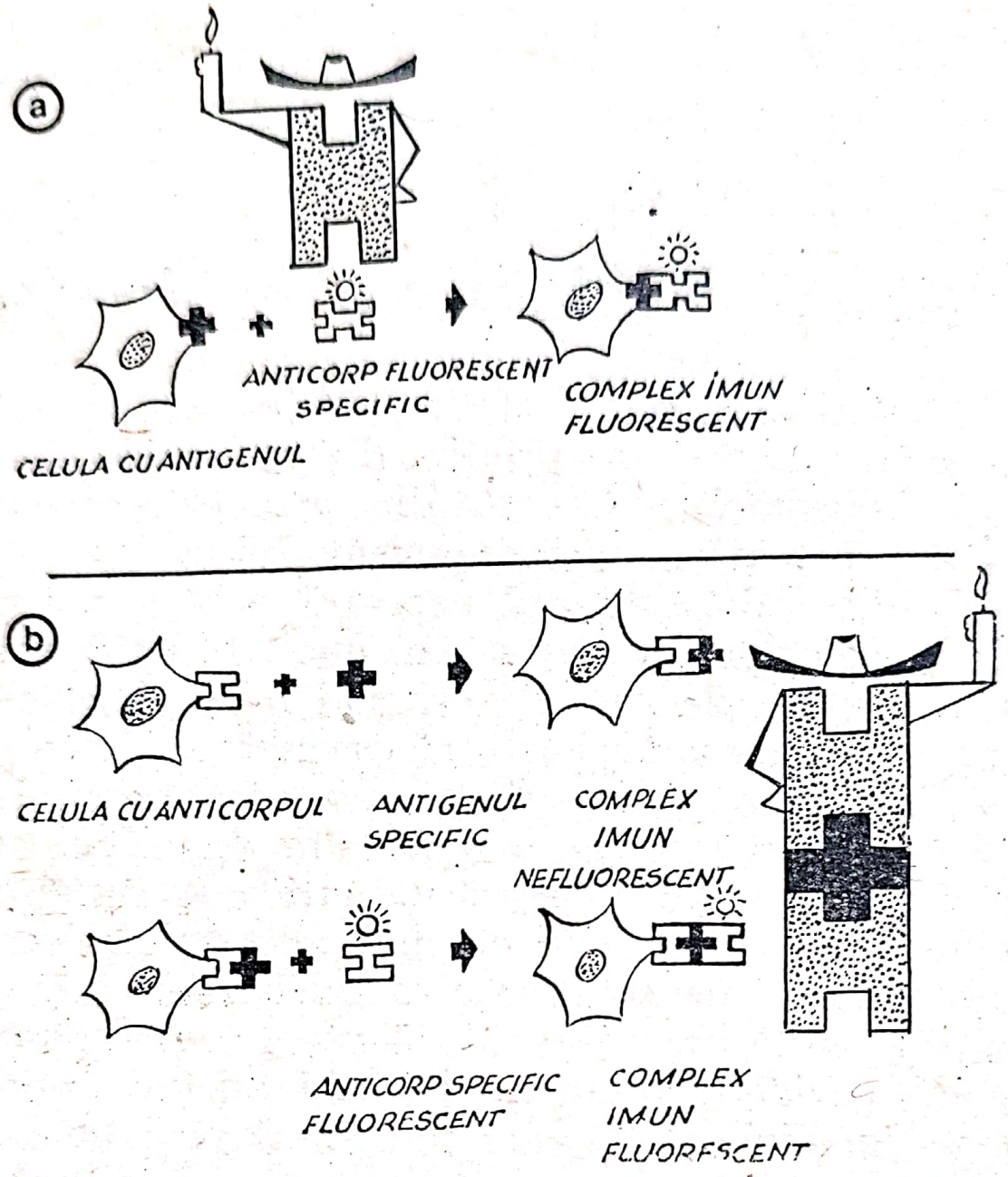


Fig. 20 — Tehnica anticorpilor fluorescenți aplicată la localizarea antigenului sau anticorpului în celulă

a. Identificarea antigenului; *b.* Identificarea anticorpului (tehnica sandviș).

peste preparat anticorpi anti-X fluorescenți, care se vor combina cu grupările determinante disponibile ale antigenului X. În acest fel, celulele care conțin anticorpi anti-X vor apărea fluorescente. La microscop, celulele plasmatice apar ca

Scanned with OKEN Scanner

niște semilune fluorescente, datorită colorării citoplasmei, care are această formă „islamică" din cauza nucleului excentric (vezi capitolul 7).

Reacția de aglutinare și complementul

Aglutinarea este cealaltă față importantă sub care poate apărea reacția dintre anticorpi și antigen atunci cînd acesta din urmă este corpuscular (hematie, microorganism, virus, celulă). Cantitatea de anticorpi necesară pentru a produce aglutinarea vizibilă a unor hematii este foarte mică, de sute de ori mai mică decît cea care este necesară pentru observarea unei reacții de precipitare. Acest lucru se datorează faptului că un globul roșu sau o celulă sînt de mii de ori mai mari decît o moleculă de anticorp, astfel că numai un număr mic de molecule de anticorp este necesar pentru formarea unei rețele insolubile. Această împrejurare a făcut ca pentru punerea în evidență a unor cantități mici de anticorpi precipitanți — care nu pot fi puși în evidență prin reacția de precipitare — să se folosească *hemaglutinarea*, în varianta sa numită *pasivă*. În acest scop se „lipește" de suprafața eritrocitului antigenul studiat și apoi se adaugă serul imun precipitant. Chiar dacă acesta conține urme de anticorpi (0,005 μg/ml), el este capabil să provoace o aglutinare vizibilă. Pentru a oferi un punct de comparație, să admitem că prin reacția de precipitare se pot pune în evidență numai cantități de anticorp mai mari de 5 μg/ml

Scanned with OKEN Scanner

și că 1 μg este egal cu a milioana parte dintr-un gram!

Dacă peste hematii de iepure se adaugă ser de cobai antihematie de iepure, se constată că aglutinarea este urmată rapid de hemoliză (vezi experiența lui Bordet descrisă în capitolul I). Dacă înainte de amestecare serul de cobai se încălzește la 56°C timp de 30 minute, se constată dispariția proprietății lui hemolitice, dar păstrarea celei aglutinante. Este suficient ca peste hematiile aglutinate să se adauge puțin ser de cobai proaspăt pentru ca hemoliza să apară din nou. Deci în serul de cobai există un factor termolabil pe care Ehrlich l-a botezat, la un an de la descoperirea sa, *complement*.

Complementul, sau abreviat C', se găsește în sîngele tuturor vertebratelor, dintre care cobaiul se distinge ca cel mai bogat posesor. El se combină cu eritrocitele (E) numai după ce acestea au fixat anticorpul (A) (eritrocite sensibilizate). Deci, pe scurt: $E + A = EA + C' =$ *hemoliză*. Complementul se leagă nu numai de complexul format din eritrocite și anticorpii sensibilizanți, ci de majoritatea complexelor antigen-anticorp, fie că antigenul este o proteină, o bacterie sau o celulă. În ultimele două cazuri, legarea complementului are, de asemenea, un efect vizibil: *bacterioliza* sau *citoliza*.

Complementul nu este un compus unitar, ci un amestec de cel puțin 9 proteine serice care se fixează foarte rapid, dar într-o succesiune bine determinată, de complexele imune. Unul dintre

Scanned with OKEN Scanner

aceștia, componentul *C'1*, care, de altfel, se fixează primul de complexul imun, este o *proesterază*. El se transformă într-o esterază prin actul fixării de complexul imun și sub această formă poate acționa asupra unor constituenți ai membranei eritrocitului (de exemplu lecitina). În urma acestei acțiuni se lezează integritatea membranei eritrocitare, aceasta se găurește și conținutul ei se scurge afară. Prin microscopie electronică s-au putut observa, în urma hemolizei, „găuri" în membrana eritrocitului. Ceilalți componenți ai complementului pot acționa asupra altor substanțe din eritrocit, însă acest lucru rămîne de dovedit.

Acțiunea hemolitică a anticorpilor depinde foarte mult de tipul de imunoglobuline de care aparțin. În timp ce două sau trei molecule de anticorpi anti-eritrocit de tip IgM sînt suficiente pentru producerea unei singure găuri în membrana eritrocitului expus la acțiunea complementului, același efect necesită participarea a 1 000 molecule de anticorp IgG. Nu toate tipurile de imunoglobuline fixează complementul (de exemplu IgA nu fixează complementul); există, de asemenea, subtipuri de IgG la cobai, care nu sînt capabile să fixeze complementul. Regiunea moleculară din imunoglobulină care participă la fixarea complementului nu este cea care poartă situsul de combinare, ci fragmentul Fc. De fapt s-a constatat că complexele imune formate numai din fragmente Fab nu fixează complementul. Iată deci că nici regiunea Fc nu este inutilă în molecula anticorpilor.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția de fixare a complementului este folosită foarte mult în laboratoare, cea mai celebră fiind reacția Bordet-Wassermann (RBW) pentru diagnosticul sifilisului. Se procedează astfel: se pune în contact antigenul *(cardiolipina)* [1] cu serul sanguin care se cercetează, în prezența unei cantități minime de complement. Dacă există anticorpi anti-treponema în ser, adică dacă pacientul este bolnav, ei se vor combina cu antigenul și vor fixa tot complementul. Dispariția complementului din soluție înseamnă deci o reacție pozitivă. Pentru a se pune în evidență această fixare, se adaugă întregului amestec hematii sensibilizate, care nu se vor hemoliza decît în prezența complementului. Lipsa hemolizei arată absența complementului, deci pacientul este bolnav de sifilis. Producerea hemolizei va arăta o reacție negativă, evidențiind că în serul analizat nu există anticorpi anti-treponemă, că nu se formează un complex imun cu cardiolipina care să poată fixa complementul și că acesta, rămînînd liber, se fixează pe hematiile sensibilizate, hemolizîndu-le. Reacția a fost schematizată în figura 21.

Reacția de *imunohemoliză* a fost aplicată în 1963 de imunologul danez Jerne la detectarea

---

[1] Cardiolipina este o haptenă lipidică extrasă din inimă de bou, care prezintă grupări determinante comune cu *Treponema pallidum*, agentul infecțios al sifilisului. De aceea, anticorpii anti-treponema din sîngele bolnavilor de sifilis se pot combina cu cardiolipina.

Scanned with OKEN Scanner

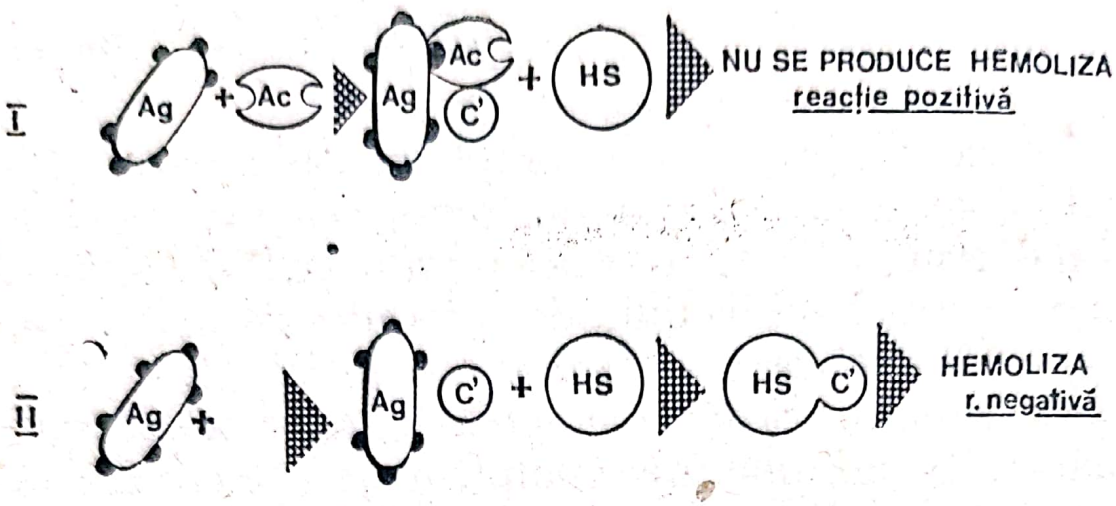


Fig. 21 — Reacția Bordet-Wassermann pentru diagnosticul sifilisului

Ag. Cardiolipina; Ac. Anticorpi anti-treponema; C'. Complement; HS. Hematii sensibilizate (hematii de berbec + anticorpi anti-hematie). În reacția II lipsesc anticorpii anti-treponema.

anticorpilor produși de o singură celulă! Această performanță constituie tehnica hemolizei locale în gel. Ea este astăzi metoda preferată de toți cercetătorii care se interesează de evenimentele celulare care condiționează și produc sinteza de anticorpi.

Metoda se practică astfel: se face o suspensie de celule limfoide în care se bănuiește că există și celule care fabrică anticorpi față de antigenul X. Se amestecă aceste celule cu hematii de care s-a legat în prealabil antigenul X. Se adaugă agar încălzit la 42°C, se amestecă și se toarnă într-o placă. După ce agarul s-a întărit, se ține placa cîteva ore la 37°C. În acest timp, anticorpii care se sintetizează în celule sînt secretați în mediul exterior și acolo se combină cu eritrocitele „îmbrăcate" cu antigenul X. Se adaugă apoi complementul (ser de cobai) care produce hemoliza tuturor eritrocitelor care au legat anticorpii. Deci în

Scanned with OKEN Scanner

jurul celulelor care au secretat anticorpi apare o coroană clară, liberă de eritrocite. Deoarece, din cauza hematiilor suspendate, gelul este opac, centrele de hemoliză apar în el ca niște plaje clare care pot fi numărate cu destulă ușurință de un ochi exersat (vezi figura 22). Cunoscînd

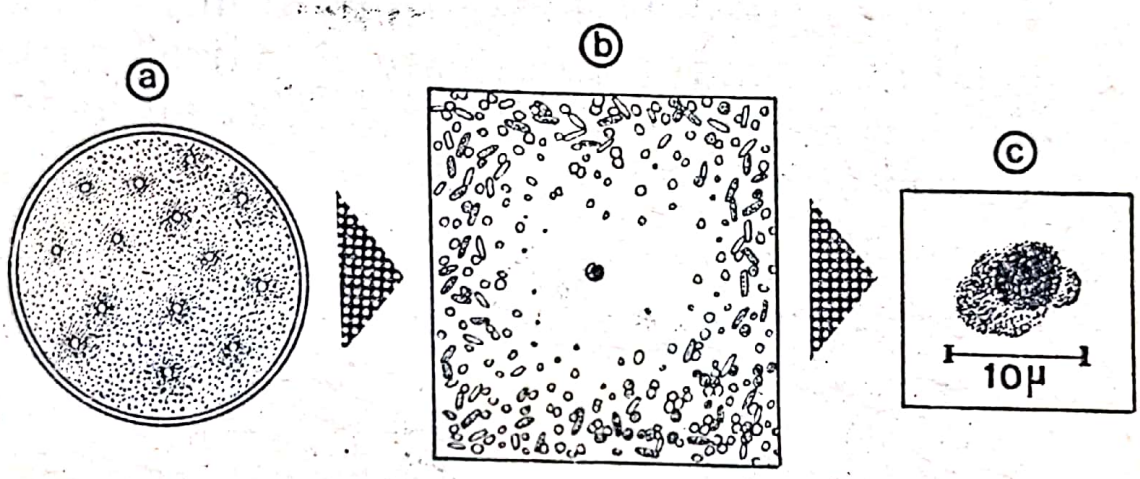


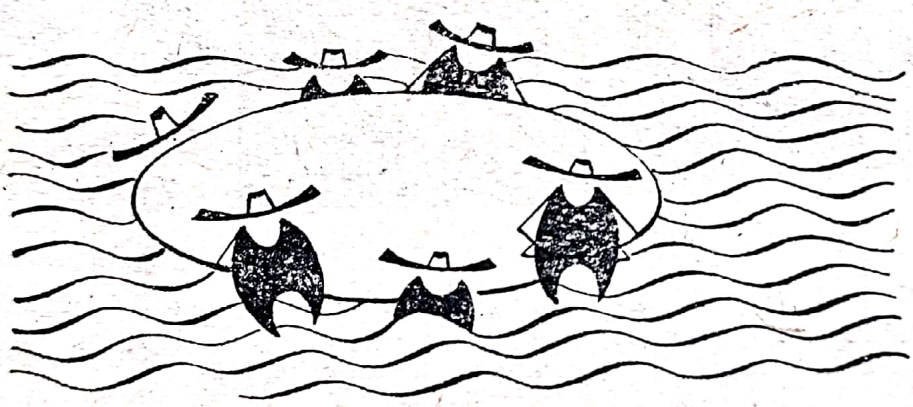
Fig. 22 — O plajă văzută cu ochiul liber și la microscop

Punctele clare marchează zonele în care s-a petrecut hemoliza (a). Un astfel de punct văzut la microscop arată ca un cerc mărginit de hematii (b), avînd în centru o celulă producătoare de anticorpi (c).

numărul celulelor introduse în placă, pe de o parte, și numărul celulelor ce fac anticorpi (= numărul de plaje), pe de altă parte, se poate evalua cantitativ variația populației de celule formatoare de anticorpi în diferite condiții experimentale. Cu această metodă s-a dovedit că în răspunsul secundar numărul celulelor ce fabrică anticorpi crește pînă la o sută ori și că aceștia din urmă își schimbă reprezentanții IgM în IgG în timpul trecerii de la răspunsul primar la cel secundar (vezi capitolele 4 și 8). Deoarece celulele sînt imobilizate în gel, ele pot fi scoase din acest mediu și apoi studiate separat. Doleanța tuturor

Scanned with OKEN Scanner

imunologilor, îngroziți de eterogenitatea cumplită a anticorpilor, de a lucra asupra unei singure celule, este pe cale de a se realiza. Mai rămîn cîteva „mici" amănunte, cum ar fi analiza chimică a unei cantități de 10^{-6} μg (a milioana parte dintr-un microgram) de anticorpi pe care o celulă îi face într-o zi de muncă! Dacă însă celula se divide și dă naștere la descendenți, atunci efortul conjugat al generațiilor cultivate „in vitro" poate furniza o cantitate de anticorpi care să nu indigneze pe nici un chimist.



Hematia în „cleștele" anticorpilor

Scanned with OKEN Scanner

11

În care se dovedește că anticorpul nu este un instrument predestinat pentru îndeplinirea unui anumit scop

Unirea anticorpului cu antigenul poate să se petreacă în organism absolut la fel ca în eprubetă, conducînd la o precipitare, o aglutinare sau la o liză. În cursul acestor fenomene fizico-chimice, antigenul poate să sufere modificări puternice care să-i schimbe starea lui inițială. Această „transformare" pe care anticorpul o induce asupra antigenului, în urma combinării lor, reprezintă mijlocul prin care organismul încearcă (și deseori reușește) să anihileze efectul perturbator al unui agent străin pătruns (scăpat) în mediul intern. În termeni biologici, modificarea stării inițiale a antigenului poate însemna: neutralizarea unei toxine, acoperirea unui microorganism cu un strat de anticorpi (pregătirea pentru fagocitare), distrugerea celulelor străine prin liza membranelor etc. Datorită acestor efecte,

Scanned with OKEN Scanner

anticorpii reprezintă pentru organism un instrument „magic" care tinde să-l readucă la starea în care se găsea înainte de a suferi atacul. De aceea, anticorpii apar ca și cum ar fi predestinați pentru îndeplinirea unui scop, și anume acela de a proteja organismul de boli. O sugestivă exemplificare a acestei situații poate fi făcută cu copii bolnavi de *hipo-gamma-globulinemie congenitală*. Neputînd sintetiza decît cantități foarte mici de gamma-globulină, deci și de anticorpi, acești copii fac toate bolile infecțioase bacteriene și de aceea nu pot să supraviețuiască. Administrîndu-li-se gamma-globulină și antibiotice, ei pot supraviețui și trăi o viață relativ normală.

Efectul protector al anticorpilor este prezent în multe boli infecțioase, microbiene și virotice, dar aceasta nu este o regulă generală. Nu trebuie să uităm că în organismul viu, contrar celor ce se petrec în eprubetă, bacteriile pe care s-au fixat anticorpii sînt în general ucise nu prin liză, ci prin înghițirea lor de către macrofage, leucocite polimorfonucleare sau alte celule fixe ale sistemului reticulo-endotelial. Multe microorganisme o dată fagocitate sînt distruse în cîteva ore printr-un proces de digestie celulară, dar există și microorganisme virulente care pot să reziste la o astfel de digestie. În acest caz, combinarea anticorpilor cu antigenul (bacteria) a fost *indiferentă* pentru organism.

Existența anticorpilor care ajută fagocitele să atace microorganismele și să le digere a fost dovedită de Wright, care i-a denumit *opsonine*, de la cuvîntul grecesc *opsono* = prepar hrană

Scanned with OKEN Scanner

pentru... Bunul său prieten Bernard Shaw n-a rezistat tentației de a le înfățișa într-o piesă de teatru intitulată „Medicul în dilemă". Iată un fragment din ea:

RIDGEON (alias WRIGHT): Opsonina este substanța cu care ungeți germenii patogeni pentru ca globulele albe să-i poată înghiți.

SIR PATRICK *(un medic bătrîn, cam sceptic)*: Nu-i ceva nou... Globulele albe, cum naiba le zice tipul ăla... Mi se pare Mecinikov... ei, cum le zice?

RIDGEON: Fagocite.

SIR PATRICK: Asta-i, fagocite ... Ei bine, am auzit de teoria asta cu mult înainte să ajungeți Dv. la modă. Și, de altfel, ele nu înghit întotdeauna germenii.

RIDGEON: Ba îi înghit dacă-i ungeți cu opsonină.

SIR PATRICK: Gogoși.

RIDGEON: Ba de loc gogoși. În realitate, iată ce se petrece. Fagocitele nu vor să înghită microbii dacă aceștia n-au fost unși. Bine, atunci bolnavul fabrică unsoarea trebuincioasă. Dar descoperirea noastră este că unsoarea asta, pe care o numesc opsonină, este produsă de organism în cantități variabile, cînd mai mult, cînd mai puțin, după un anumit ritm (...)

Anticorpii pot fi și *nocivi* pentru organismul în care se formează. Să injectăm un cobai cu o cantitate mică de ovalbumină (1 mg) și după o pauză de trei săptămîni să repetăm tratamentul injectînd *intravenos* o cantitate de zece ori mai mare de ovalbumină. Cobaiul injectat începe să-și scarpine botul, strănută, părul de pe ceafă i se

Scanned with OKEN Scanner

zbîrlește, se mișcă neliniștit prin cușcă, începe să-și tîrască picioarele din spate, cade pe o parte și cu toate eforturile nu mai poate să se ridice, pierde urina, începe să respire din ce în ce mai rar și cu multă dificultate și apoi moare. Deschizînd cutia toracică constatăm că, deși animalul este mort, inima lui mai bate, iar plămînii sînt umflați și elastici ca o minge de cauciuc. Totul s-a consumat în numai 5 minute de la injectarea ovalbuminei. Animalul a murit în urma unui *șoc anafilactic*. După prima injecție, numită de sensibilizare, în celulele imunocompetente expuse la ovalbumină începe sinteza de anticorpi, care, după un timp, se varsă în circulație. Deoarece cantitatea de antigen administrată a fost mică, cantitatea de anticorpi produsă a fost și ea corespunzător mai scăzută, astfel că după trei săptămîni de la injecție în sîngele animalului nu se mai găsește decît o cantitate extrem de mică de anticorpi; în schimb, pe suprafața celulelor care au fost expuse la antigen *(celule Y)* se găsesc anticorpi specifici. La reinjectarea ovalbuminei intravenos (injecție de declanșare), antigenul ajunge pînă la nivelul celulelor pe care se găsesc anticorpii „santinelă" și se combină cu ei. În urma acestei „ambuscade", celulele sînt distruse și eliberează *histamină, serotonină, bradichinină* ș.a. Aceste substanțe se varsă în sînge, produc o vasodilatație extremă și contracția mușchilor netezi, ceea ce provoacă manifestările clinice locale la nivelul plămînului și al vaselor capilare. Dacă se administrează ovalbumină cobailor hiperimunizați în prealabil cu această proteină, nu se constată nici un simptom de șoc, deoarece,

Scanned with OKEN Scanner

în acest caz, în sîngele animalelor există o cantitate de anticorpi suficient de mare pentru a nu permite antigenului să ajungă în contact *direct* cu celulele producătoare de anticorpi. Apare deci clar că o reacție antigen-anticorp poate fi nocivă pentru organism cînd se petrece la nivelul celulelor care produc anticorpii. Deosebirea dintre starea imună și starea anafilactică este ilustrată în figura 23.

Exemplele de mai sus au avut drept scop să „demitizeze" acțiunea anticorpilor și să arate că ei îndeplinesc o funcție care nu are nici o predes-

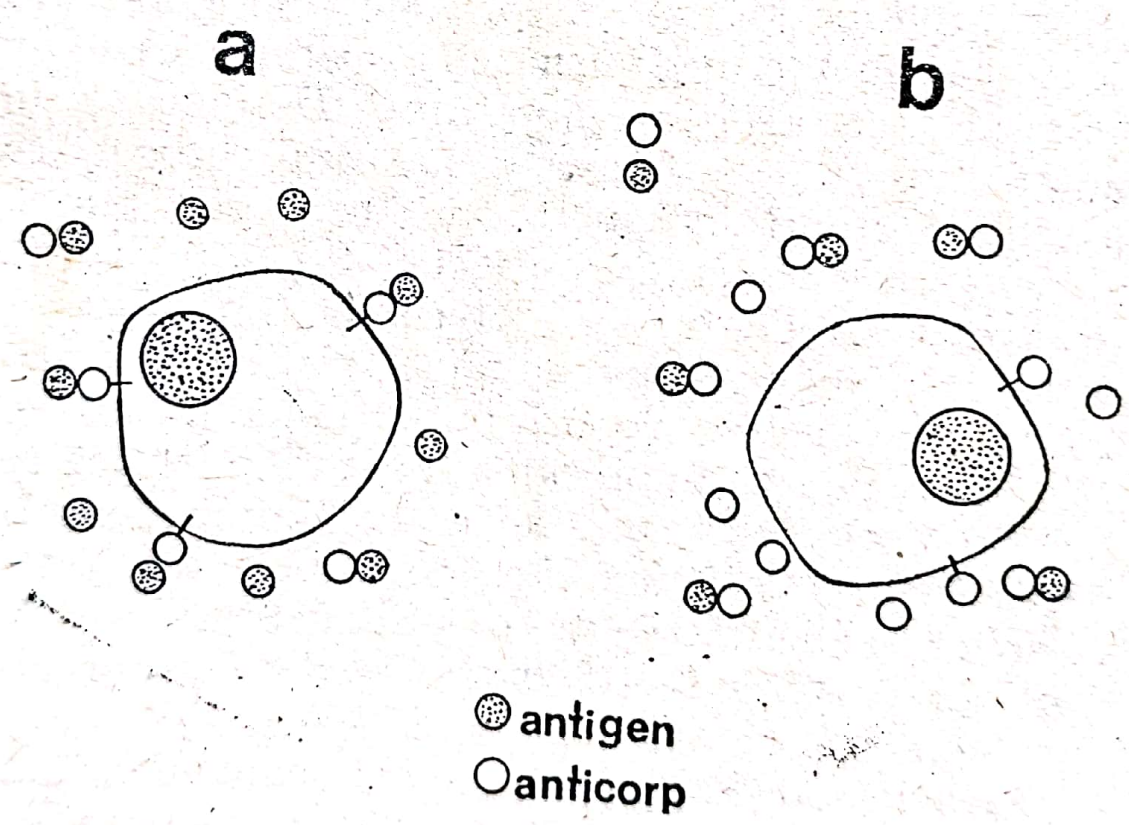


Fig. 23 — Drumul unui antigen spre o celulă imunocompetentă

Stare de imunitate (b) (anticorpii circulanți sînt în antitate suficientă pentru a intercepta toate moleculele de antigen). Stare de anafilaxie (a) (anticorpii circulanți sînt în cantitate insuficientă și nu pot preveni unirea unor molecule de antigen cu anticorpii fixați de celulă).

Scanned with OKEN Scanner

) ; re — combinarea cu antigenul care le-a dat naștere. Această funcție este uneori utilă organismului, dar nu de puține ori ea îi este indiferentă sau chiar îl vatămă.

Vaccinarea și seroterapia

Anticorpii pot fi folosiți fie pentru a preveni o îmbolnăvire (scop profilactic), fie pentru a trata o îmbolnăvire (scop terapeutic). Prevenirea îmbolnăvirii se realizează punînd organismul să-și fabrice singur anticorpii față de agentul patogen care produce boala. Acest lucru se realizează prin vaccinarea organismului, operație care nu este altceva decît o imunizare. Desigur că în acest scop nu se folosește agentul patogen ca atare, ci omorît, atenuat (îmblînzit) sau pur și simplu un extract de antigene din acest agent dezintegrat. Pentru a determina un răspuns secundar prelungit, cu un nivel ridicat de anticorpi, este nevoie de cel puțin două inoculări. De aceea, pentru imunizarea antipoliomielitică se fac două vaccinări: una la 3—12 luni și revaccinarea între 1 și 7 ani. La fel, imunizarea antivariolică beneficiază de o primă inoculare la copiii în vîrstă de 3—15 luni și apoi de o revaccinare la 7 ani.

Prezența anticorpilor în sîngele oamenilor sau animalelor imunizate față de un agent patogen dat conferă organismului o imunitate față de boala pe care o provoacă acest agent. Această imunitate se păstrează atît timp cît organismul fabrică

Scanned with OKEN Scanner

anticorpi într-o cantitate suficient de mare pentru a asigura distrugerea agentului patogen cu care organismul poate veni în contact întîmplător. Rezultă de aici că vaccinările au un scop profilactic, adică ele împiedică apariția unei boli sau o fac să se manifeste mai blînd, dar nu tratează boala o dată ce aceasta s-a declanșat. De aceea, vaccinurile sînt un instrument de imunoprofilaxie. Dacă între momentul în care organismul a intrat în contact cu agentul patogen și cel în care acesta ajunge la sediul celulelor de unde se declanșează boala trece un timp destul de lung, atunci vaccinarea poate reprezenta și un mijloc terapeutic. Este cazul binecunoscut al vaccinării antirabice, care se face în scop terapeutic. Deoarece virusul face o plimbare de cîteva săptămîni de la locul mușcăturii pînă la creier, se poate utiliza acest interval pentru producerea anticorpilor antirabici, imunizînd persoanele mușcate cu un virus atenuat. Organismul produce anticorpi față de virusul atenuat și aceștia „interceptează" virusul viu în drumul lui funest spre creier și îl distrug.

Atunci cînd boala s-a declanșat, ea poate fi combătută introducînd în organism anticorpi gata formați. Ei vor putea fi îndreptați fie împotriva agentului patogen, fie împotriva substanțelor toxice pe care acesta le secretă otrăvind organismul. Vor putea fi utilizați în această acțiune numai anticorpii care sînt capabili fie să distrugă agentul patogen, fie să-i neutralizeze toxinele. Dacă anticorpii nu pot exercita unul din aceste două efecte, atunci evident că injectarea lor în organism devine inutilă.

Scanned with OKEN Scanner

Ca sursă de anticorpi pot fi folosite serurile animalelor hiperimunizate față de agentul patogen sau toxinele pe care le elaborează acesta, serurile unor oameni care au fost vaccinați față de agentul patogen sau serurile unor indivizi care au făcut recent boala și sînt în convalescență. În toate cazurile, serurile trebuie să conțină o cantitate destul de mare de anticorpi pentru ca să se obțină un efect favorabil. Seroterapia a fost prima consecință practică după descoperirea anticorpilor, aceste două evenimente fiind atît de strîns legate, încît este greu de spus dacă anticorpii au permis seroterapia, sau seroterapia a descoperit anticorpii. Administrarea serului este pîndită de spectrul anafilaxiei, deoarece pe lîngă anticorpi el conține toate celelalte proteine serice. Repetînd injecția cu serul salvator, medicul riscă să-și omoare sau să-și îmbolnăvească grav pacientul, din cauza șocului anafilactic sau a altor fenomene de hipersensibilitate declanșate de proteinele animalului care a furnizat serul. Această tristă posibilitate a apărut aproape o dată cu seroterapia și a adus în 1892 tratamentele lui Behring la un impas: serurile oilor imunizate cu toxină difterică cînd salvau, cînd omorau copiii bolnavi de difterie. Abia după un deceniu Richet a descoperit anafilaxia și s-au putut căuta rațional mijloace noi de a face seroterapia lipsită de riscuri. Astăzi, serurile imune obținute pe animale sînt debarasate de toate componentele lor proteice, mai puțin anticorpii specifici și gamma-globulinele. Sînt utilizate serurile de proveniență umană, din care se izolează numai gamma-glo-

Scanned with OKEN Scanner

bulinele ce conțin anticorpii specifici; în unele cazuri se desprinde din molecula anticorpilor fragmentul „inactiv" Fc, obținîndu-se preparate care pot fi inoculate chiar intravenos, fără nici un pericol.

Deoarece viața anticorpilor introduși dintr-un organism în altul este destul de scurtă apare clar că imunoterapia cu anticorpi trebuie să aibă caracterul unui tratament de șoc care să elimine *rapid* cauza bolii. Acest lucru poate fi realizat eficient mai ales cu toxinele; de aceea serurile anti-toxice sînt intens folosite în seroterapie. Sînt utilizate mai ales antitoxinele: tetanică, difterică, botulinică, a cangrenei gazoase și față de veninul șerpilor.

Administrarea anticorpilor gata formați se poate face și în scopuri profilactice. Astfel se folosește gamma-globulina umană. Utilizarea ei pornește de la ideea că serul adulților normali conține cantități mai mari sau mai mici de anticorpi față de o mare varietate de agenți infecțioși la care populația respectivă este expusă continuu. Cînd se amestecă serul de la persoane din aceeași regiune sau țară, există șanse mari ca în acest amestec să se găsească cantități însemnate de anticorpi față de viruși ca cei ce produc pojarul, rubeola, oreionul, poliomielita și hepatita infecțioasă. Deoarece cantitatea de anticorpi necesară pentru o protecție eficientă față de aceste virusuri este scăzută, este posibil ca administrarea unui preparat concentrat de gamma-globulină obținută dintr-un amestec de seruri să exercite o acțiune protectoare față de aceste boli. Deoarece

Scanned with OKEN Scanner

durata de incubație a acestor boli este destul de lungă (peste două săptămîni), este posibil ca administrarea gamma-globulinei acelor persoane care au intrat în contact cu virusul să fie salutară și să împiedice declanșarea bolii.

Anafilaxia și alergia

Prezența anticorpilor în sînge sau numai în celulele formatoare de anticorpi poate fi profund dăunătoare organismului. Un exemplu elocvent este anafilaxia, descrisă înainte, care este din fericire un fenomen rar, pe care, oricît ar părea de curios, îl produc mai degrabă medicii decît natura. Șocul anafilactic este un însoțitor nedorit al seroterapiei, vaccinoterapiei și al tuturor „testelor" pe care medicii le fac asupra pacienților sensibilizați.

Unul din puținele șocuri anafilactice „naturale" este „moartea în leagăn". Copii sănătoși, între 6 și 9 luni, sînt hrăniți și apoi lăsați să doarmă. Încercînd să fie treziți pentru următoarea masă, se constată că ei sînt morți. Peste 2 000 de copii mor astfel anual în Anglia. Cauza morții apare misterioasă. Ea lovește copiii hrăniți cu biberonul, niciodată pe cei ce primesc laptele de la sîn. Copiii hrăniți cu lapte de vacă fac anticorpi față de proteinele din acest aliment încă din a doua săptămînă de la nașterea lor. Acest lucru este posibil deoarece cîteva zile după naștere poarta intestinului este încă „deschisă" pentru proteine, astfel că acestea sînt absorbite și trec

Scanned with OKEN Scanner

în sînge fără pierderea structurii lor antigenice. Deși această cale de introducere a antigenelor în organism se închide curînd, intestinul dobîndind capacitatea de a distruge proteinele alimentare, intervalul de timp este suficient pentru ca proteinele din laptele de vacă să sensibilizeze organismul. Declanșarea șocului anafilactic se produce printr-un incident banal, foarte obișnuit la copii, și anume inhalarea unei mici cantități de lapte vomitat în timpul somnului. Cantitatea inhalată este atît de mică încît copilul poate nici să nu tușească, însă contactul proteinelor din lapte cu traheea face ca ele să intre rapid în circulația pulmonară și să declanșeze șocul anafilactic. El se manifestă doar printr-o scădere continuă a respirației pînă la exitus. Moartea se petrece în liniște, deoarece în starea de inhibiție pe care o dă somnul nu se mai pot manifesta simptomele violente, dramatice pe care le-am descris la cobaiul în șoc anafilactic.

Un alt exemplu foarte bine cunoscut de acțiune nocivă a anticorpilor este *alergia*[1] sau, cum o mai numesc imunologii, *hipersensibilitatea*. Ea este rudă bună cu anafilaxia, numai că este mai miloasă cu posesorii ei: îi chinuiește pînă la exasperare, dar nu-i omoară! Dintre bolile alergice mai bine cunoscute sînt: *febra de fîn*, *astmul bronșic*, *dermatitele* și *urticaria*. Aceste boli sînt declanșate de contactul repetat al organismului

[1] Termenul a fost creat de Pirquet și înseamnă reactivitate alterată. Această definiție reflectă nivelul cunoștințelor de atunci (1910) cînd se considera că reacțiile imune nefavorabile pentru organism nu au nimic comun cu reacțiile imune protectoare.

Scanned with OKEN Scanner

uman cu antigene (= *alergene*) pe care mediul înconjurător i le scoate în cale. Astfel, febra de fîn este provocată de contactul mucoaselor respiratorii superioare cu polenul unor plante, printre care se remarcă secara și timoftica. Astmul bronșic, manifestat prin crize de sufocare, este cauzat de constricția bronchiolelor, provocată de pătrunderea repetată în organism, fie pe cale respiratorie, fie pe cea digestivă, a unor alergene, ca: părul cailor, al cîinilor, pisicilor, pene, polen, clei de tîmplărie, paie, praf menajer ș.a. Pe cale intestinală pătrunderea se face prin diferite produse alimentare (ouă, lapte, grîu, căpșuni, bere ș.a.) și medicamente (aspirină, chinină, antipirină, penicilină ș.a.) Contactul alergenilor mai sus-amintiți cu organismul poate declanșa dermatite (eczeme) și urticarie. Ultima este bine cunoscută ca fiind produsă de fructe, mai ales de fragi și căpșuni.

În sîngele oamenilor care suferă de alergie se pot pune în evidență anticorpi capabili să reacționeze cu alergenul. Acești anticorpi, numiți *reagine*, sînt niște imunoglobuline de tip E (IgE) ce au proprietatea de a se lega specific atît de alergenul corespondent, cît și de unele zaharuri care se găsesc pe suprafața celulelor din piele. Tocmai această fixare a lor pe piele face ca prezența lor acolo să se manifeste prin inflamația pielii din dermatitele și urticariile alergice. Dacă reaginele sînt încălzite la 56°C, ele își pierd capacitatea de a se mai fixa de piele și, deși ele își păstrează însușirea de a se combina cu alergenul, nu mai sînt capabile să dea naștere *papulei* și *eritemului* caracteristice

Scanned with OKEN Scanner

alergiei. Deci reaginele nu acționează decît fixate de celulele din piele, ceea ce adevereşte dictonul, deja amintit: corpora non agunt nisi fixata!

Combinarea reaginei cu alergenul eliberează local, ca și în șocul anafilactic, o cantitate însemnată de histamină, care este în bună parte responsabilă pentru manifestările clinice ale alergiilor. Alături de histamină, celulele vătămate pun în libertate și alți factori chimici, unii cu o structură necunoscută, cuprinși sub denumirea de *substanțe care reacționează încet (slow reacting substances)*, care exercită o puternică acțiune constrictoare asupra bronchiolelor. Efectele dezagreabile ale descărcării histaminei pot fi combătute cu ajutorul unor medicamente antihistaminice (de exemplu cu romergan), capabile să contracareze acțiunea excesului de histamină. Deoarece antihistaminicele n-au nici o acțiune asupra substanțelor care reacționează încet, se poate înțelege de ce un tratament cu romergan poate estompa manifestările clinice ale alergiilor, dar nu le suprimă complet.

Majoritatea oamenilor normali sînt capabili să fabrice reagine, dar, cu toate acestea, numai un număr mic de indivizi prezintă alergii. Acest lucru se explică prin aceea că unii indivizi au o predispoziție ereditară de a face cu o promptitudine neobișnuită anticorpi de acest tip, asociată cu o sensibilitate mare față de histamină. Date statistice din Anglia au dovedit că din 504 bolnavi cu hipersensibilitate aproape jumătate aveau unul sau ambii părinți suferinzi de aceeași boală, în timp ce oamenii sănătoși aveau părinții bolnavi doar în 15% din cazuri. La manifes-

Scanned with OKEN Scanner

tarea unei alergii, o problemă deosebit de dificilă este stabilirea alergenului care a provocat-o. Cum numărul de alergene posibile este foarte mare, diagnosticul constă în introducerea în pielea bolnavului, prin zgîrieturi, a tuturor materialelor cu care pacientul ar fi putut veni în contact, și urmărirea efectului acestei testări. Zgîrietura în care s-a depus alergenul ce provoca suferința se înroșește și se umflă puțin, semnalînd astfel agentul de care bolnavul trebuie să se ferească. Trusa medicului testator conține mai bine de 150 de alergeni de proveniență foarte ciudată: condimente, semințe, ouă, carne, bere, vin, tutun, nuci, albine etc. etc. Pacienții la care s-a stabilit prin testele cutanate alergenul excitant beneficiază de un tratament imunologic numit *desensibilizare*. El constă în injectarea gradată, în doze din ce în ce mai mari, a alergenului suspectat. În urma acestui tratament, în serul bolnavilor apar anticorpi de tip IgG, care sînt capabili să se combine cu alergenul și să nu mai permită interacțiunea lui cu reaginele IgE care sensibilizează pielea. Blocarea activității reaginelor stinge manifestările bolii alergice. Este un exemplu frumos care arată cum acțiunea nocivă a unui anticorp (reagina) poate fi stinsă tot printr-un anticorp!

Scanned with OKEN Scanner

12

În care se vorbește despre rolul anticorpilor în transplantări, cancer și boli autoimune

Milioane de oameni sînt astăzi la curent cu transplantările de organe (mai ales de inimă). Piele, rinichi, inimă, plămîni, ficat etc., etc. se trec dintr-un individ în altul cu o nonșalanță și o artă chirurgicală care uluiește. Și ca după o astfel de minune organul transplantat să nu funcționeze în corpul primitorului decît cîteva săptămîni și apoi să se distrugă este cumplit de dezamăgitor. Ce forță misterioasă se ridică în organismul primitorului împotriva organului salvator grefat? Sînt, așa cum se poate ușor ghici, tot anticorpii, dar și celulele care-i sintetizează. Apariția lor se datorează faptului că, cu excepția gemenilor uniovulari, între oameni există diferențe de ordin genetic. Aforismul : „oamenii nu seamănă unul cu altul și sînt foarte mulțumiți de aceasta“ nu este totdeauna adevărat, mai ales atunci cînd

Scanned with OKEN Scanner

este vorba de transplantări... Diferențele genetice dintre indivizi sînt exprimate, de fapt, prin sintetizarea unor substanțe chimice diferite, astfel că indivizii cu o constituție genetică diferită vor diferi, pînă la un punct, și în ceea ce privește constituția lor chimică. Printre substanțele care alcătuiesc această constituție chimică specifică unui individ sau unui grup de indivizi se numără și antigenele celulare; de aceea, diferențele genetice dintre indivizi se reflectă în diferențe de structură chimică a unor antigene (vezi capitolele 4 și 5). Antigenele la nivelul cărora se manifestă diferențe între indivizi aparținînd aceleiași specii se găsesc localizate, de obicei, pe suprafața celulelor (în membrană) și au primit denumirea generică de *antigene de histocompatibilitate*. Deși mici, aceste diferențe în antigenele de histocompatibilitate dintre doi indivizi sînt suficiente pentru a cauza insuccesul transplantărilor. Este buturuga mică ce încă răstoarnă carul străduințelor chirurgilor, punînd sub semnul incertitudinii întreaga lor artă tămăduitoare.

Grefarea unei inimi va însemna introducerea în organismul primitorului, pe lîngă numeroase antigene comune între inima donatorului și primitorului, și a unor antigene sau poate numai grupări determinante caracteristice donatorului, dar absente în inima înlocuită a bolnavului. În consecință, organismul primitorului tratează aceste antigene drept „străine" și sintetizează anticorpi împotriva lor. Anticorpii formați se îndreaptă spre noua inimă și se combină cu acele celule ce conțin antigenul

Scanned with OKEN Scanner

străin. Această unire este funestă pentru organul grefat, deoarece anticorpii sînt mai toxici ca cea mai puternică otravă, distrugînd celulele. Această acțiune progresează pe măsură ce se sintetizează din ce în ce mai mulți anticorpi și sfîrșește, cum bine se știe, cu respingerea organului transplantat.

Armele de luptă împotriva anticorpilor antigrefă nu sînt încă cele mai bune; de aceea nici rezultatele nu sînt satisfăcătoare. Nici unul din procedeele folosite astăzi nu reușește să oprească complet sinteza acestor anticorpi citotoxici, ci numai să o micșoreze pînă la un nivel care să fie „suportabil" pentru grefă. În acest scop, înainte de intervenția chirurgicală, se iradiază organismul primitor cu o doză de *raze X* astfel aleasă încît să se scadă mult capacitatea celulelor de a forma anticorpi, fără însă a vătăma prea mult celelalte funcții vitale ale organismului. După grefare se administrează bolnavului medicamente care au capacitatea de a *deprima* sinteza de anticorpi. Ele nu sînt altceva decît inhibitori ai sintezei proteice, despre al căror mod de acțiune s-a vorbit înainte (capitolul 8). În sfîrșit, alternativ cu aceste medicamente *imunosupresive*, se administrează și un *ser imun antilimfocitar*, care are proprietatea de a bloca și distruge limfocitele, adică celulele care sintetizează anticorpi. Acțiunea combinată a acestor tratamente prelungește funcționarea unui organ transplantat de la cîteva săptămîni pînă la ani de zile, așa cum s-a raportat pentru cîteva cazuri „fericite" de transplantări de rinichi. Acest tratament reprezintă însă o armă cu două tăișuri, deoarece, acționînd nespe-

Scanned with OKEN Scanner

cific, adică distrugînd sau încetinind activitatea celulelor care produc anticorpi de diferite specificități, și nu numai pe a celor care produc anticorpii anti-grefă, dezarmează organismul și îl lasă la cheremul oricărei agresiuni. Administrarea masivă a antibioticelor este o măsură derivată din această realitate, însă ea nu reprezintă decît un paleativ. Fiindcă vine un moment în care organismul începe să fie „intoxicat" chiar prin medicamentele administrate și se impune „îmblînzirea" sau chiar oprirea tratamentului. Și atunci, în funcție de starea în care se găsește organismul, el poate fie să înceapă să fabrice din nou anticorpi anti-grefă și să rejecteze „corpul străin", fie să se îmbolnăvească de una din bolile infecțioase curente care îl găsesc însă fără nici o apărare. În ambele cazuri, sfîrșitul este același: moartea.

Prinderea grefelor este deci condiționată de împiedicarea sintezei anticorpilor anti-grefă, fără ca să se perturbeze însă funcționarea normală a întregului organism. Acest lucru s-ar putea realiza cu ajutorul fenomenului de toleranță imunologică (vezi capitolul 9). Făcînd individul primitor tolerant față de antigenele de histocompatibilitate din organul donatorului, s-ar suprima capacitatea primitorului de a sintetiza anticorpi față de antigenul străin. Această posibilitate a fost demonstrată prin numeroase experiențe pe animale, care au fost împinse atît de departe încît s-au putut obține antigene de histocompatibilitate pure sau aproape pure și cu ajutorul lor s-au putut pregăti animale care să tolereze grefele. Din păcate, ce-i bun pentru șoareci nu-i bun

Scanned with OKEN Scanner

pentru oameni! Cu alte cuvinte, condițiile în care se efectuează experiențele pe șoareci nu pot fi aplicate la oameni, fie și numai din motivul că pe aceștia din urmă nu se pot face experiențe în care să se rișteviața individului, chiar dacă el este un voluntar. În plus, toleranța imunologică se induce mai ales în perioada ce urmează imediat după naștere. Deci ar trebui găsit un fel de *anavaccin polivalent* care, inoculat copiilor nou-născuți, să permită ca, în tot cursul vieții lor viitoare, ei să fie apți să accepte orice fel de organ de la orice semen al lor, ceea ce pentru cel mai indulgent imunolog apare astăzi puțin fantastic.

Mai multe șanse de succes ar avea încercarea de a împărți oamenii pe grupe după tipul de antigene de histocompatibilitate pe care le conțin în diferite organe. O astfel de împărțire există la grupele sanguine; să nu uităm că transfuziile de sînge au devenit sigure abia cînd s-a putut determina grupa sanguină de care aparține un individ și ce condiții trebuie să îndeplinească sîngele donatorului pentru a fi acceptat. Delimitarea grupelor ar face ca pentru transplantări să se aleagă un organ care să aibă antigenele de histocompatibilitate foarte asemănătoare, dacă nu chiar identice, cu cele ale organului pe care îl înlocuiește. În acest fel, riscul ca organismul care a primit grefa să sesizeze o diferență între organul vechi și cel nou s-ar reduce considerabil. Calea de a identifica indivizii care prezintă aceeași specificitate alotipică (vezi capitolul 5) pentru un antigen de transplantare dat nu apare de loc ușoară, ținînd seama că aici nu e vorba de a scoate o picătură de sînge din degetul oamenilor, așa cum

Scanned with OKEN Scanner

a procedat Landsteiner în 1900 pentru stabilirea grupelor sanguine. Aici materialul de analiză este organul, din care este practic imposibil de a scoate fragmente pentru cercetare. Din fericire, un antigen de histocompatibilitate oarecare nu se găsește localizat numai într-un singur organ, ci el poate apărea chiar în stare liberă în umorile organismului. Astfel, antigenul de histocompatibilitate *H-2*, care guvernează transplantările de piele la șoarece, se găsește și în ficat, splină, lichidul de ascită, sucul gastric și chiar în sînge. Deci, cu condiția de a privi mereu comparativ, o serie de antigene de histocompatibilitate ar putea fi obținute de la oameni fără nici un atentat la integritatea organelor lor. La stabilirea grupelor sanguine s-a aplicat o metodă rapidă, care determină compatibilitatea dintre doi parteneri prin simpla amestecare a sîngelui donatorului cu serul primitorului (aglutinare = incompatibilitate). Se puteau examina sute de probe de sînge într-o singură zi. În cazul transplantării organelor (de exemplu a rinichiului, a pielii), singura metodă prin care se stabilește compatibilitatea sau incompatibilitatea dintre parteneri este aceea care indică acceptarea sau respingerea grefei, dar aceasta consumă timp și necesită grefe cutanate pe voluntari. Nici aici situația nu este chiar atît de neagră, deoarece s-a arătat că injectînd în pielea unor donatori potențiali o suspensie de limfocite obținute din sîngele primitorului, se constată în 48 de ore apariția unei roșeli și a unei induraţii a căror intensitate este proporțională cu gradul diferenței de histocompatibilitate între donator și primitor. Această metodă, *a transferului de limfocite normale*,

Scanned with OKEN Scanner

chiar dacă este departe de a fi cea ideală pentru testarea compatibilității dintre parteneri, arată că drumul stabilirii grupelor de histocompatibilitate la om poate ajunge la țel.

Anticorpii ajută creșterea tumorilor?

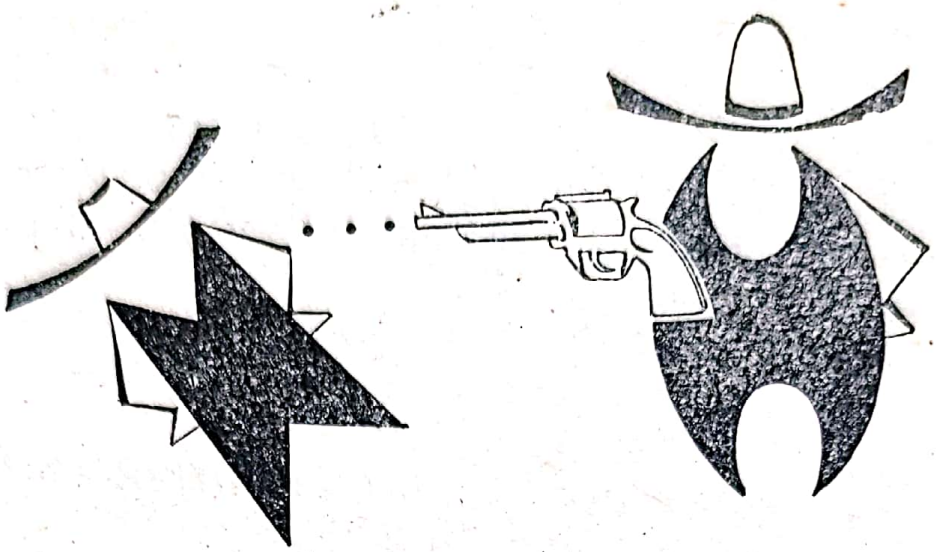
Un alt gen de transplantări, mai puțin cunoscute, sînt cele vizînd tumorile canceroase. O tumoră canceroasă se poate transplanta de la un animal la altul, numai cu condiția ca ele să aparțină aceleiași linii consanguine. În caz contrar, tumora, ca și oricare altă grefă, este respinsă. Studiul transplantării tumorilor a permis descoperirea unui fenomen paradoxal, în care din nou anticorpii joacă rolul principal.

Iată un model experimental: șoareci albi dintr-o linie pură au fost imunizați cu țesut tumoral omorît provenit de la o altă linie pură de șoareci cenușii astfel ca în serul lor să se detecteze anticorpi față de acest țesut. În acest moment li s-au transplantat celule tumorale vii luate de la șoareci cenușii. Tumora transplantată, în loc să fie respinsă rapid, din cauză că deja erau formați anticorpi, crește atît de bine încît poate chiar să devină permanentă. În acest timp, șoarecii care nu au fost imunizați resping tumora, care se topește văzînd cu ochii și dispare. Mai mult, luînd ser de la animale imunizate cu țesut tumoral omorît și administrîndu-l șoarecilor normali din aceeași linie, concomitent cu transplantarea tumorii, se constată că ei o acceptă tot atît de repede

Scanned with OKEN Scanner

și de bine ca și șoarecii imunizați cu țesutul tumoral omorît. Cu alte cuvinte, anticorpii din ser ușurează creșterea tumorii. Acest fenomen uimitor s-a numit *facilitare imunologică* (*immunological enhancement*, în limba engleză, sau *facilitation immunologique*, în limba franceză). Explicarea acestui mecanism paradoxal implică luarea în considerare a două procese dintre care cu unul ne-am mai întîlnit: 1. anticorpii facilitanți pot să împiedice respingerea grefei combinîndu-se cu antigenul, inhibînd astfel răspunsul imun. Am arătat înainte (capitolul 8) că administrarea anticorpilor gata formați la începutul declanșării unui răspuns imun poate să-l inhibe complet, din cauză că împiedică ajungerea antigenului la celulele imunocompetente. Existența acestui mecanism presupune, în cazul de față, ca anticorpii facilitanți să se combine cu antigenul de histocompatibilitate de pe suprafața celulelor canceroase, dar să nu provoace nici un efect citotoxic. Creșterea tumorii se datorează nu numai faptului că legarea anticorpilor facilitanți nu provoacă nici un neajuns celulelor, ci și faptului că ei opresc fie ajungerea antigenului de histocompatibilitate la celulele imunocompetente și blochează declanșarea sintezei anticorpilor citotoxici, fie, dacă acești anticorpi citotoxici totuși se formează, împiedică legarea lor de celule. Anticorpii facilitanți aparțin de alt tip de imunoglobuline decît anticorpii citotoxici. La șoarece s-a arătat că anticorpii citotoxici sînt legați de fracțiunea cu mobilitate electroforetică mică (IgG), în timp ce anticorpii facilitanți au o viteză electroforetică mai mare (Ig ?). 2. Anticorpii facilitanți se combină

Scanned with OKEN Scanner



Anticorpi contra anticorpi

cu antigenele tumorii și o protejează de acțiunea distrugătoare a celulelor limfoide imune. Acest proces pune accentul pe acțiunea citotoxică pe care o au aceste celule. Ele se pot lega de celulele canceroase-țintă prin intermediul anticorpilor anti-grefă pe care îi poartă pe suprafața lor. Moartea celulelor tumorale se produce datorită incapacității lor de a se divide. Deci, distrugerea unui transplant sau a unei tumori se datorează cooperării dintre anticorpii citotoxici anti-grefă și celulele limfoide ce sintetizează acești anticorpi. După cum se poate observa, rolul anticorpilor facilitanți este acela de a împiedica celulele tumorale să fie distruse prin blocarea mecanismelor umorale sau celulare.

Așa cum la desensibilizare anticorpii blocanți împiedicau reaginele să declanșeze fenomenele alergice, tot așa la stimularea creșterii tumorilor anticorpii facilitanți împiedică anticorpii citotoxici liberi sau legați de celule să distrugă tumora.

Scanned with OKEN Scanner

Se pune întrebarea dacă astfel de anticorpi facilitanți nu s-ar putea obține față de grefele de organe, fiindcă în acest caz transplantările și-ar găsi o rezolvare imunologică pe cît de elegantă, pe atît de fericită. Se lasă viitorului răspunsul la întrebarea noastră!

Autoagresiunea

Ultimul ecou al conflictului dintre antigen și anticorp privește autoimunitatea și relațiile ei cu bolile omului.

Procesul prin care un component antigenic aparținînd organismului propriu declanșează producerea de anticorpi față de el însuși se numește *autoimunizare*. Anticorpii produși față de antigenele proprii se numesc *auto-anticorpi*, iar procesele patologice pe care le poate declanșa reacția anticorpilor cu antigenele proprii constituie *boala autoimună*.

Autoimunizarea poate fi produsă prin cel puțin patru procese:

1. Dacă un component antigenic sau un tip de celulă nu se formează decît după ce se încheie perioada de imaturitate imunologică în care se face recunoașterea materialului propriu (vezi capitolul 9). Este cazul spermatozoizilor care apar numai după viața embrionară și sînt suficient de deosebiți de celelalte celule pentru a acționa ca antigen chiar în organismul care i-a făcut. Ei nu se manifestă ca antigene fiindcă sînt separați anatomic de celulele imunocompetente. Cînd

Scanned with OKEN Scanner

însă, prin infectarea testicolelor cu virusul oreionului bariera este coborîtă, spermatozoizii intră în contact cu celulele imunocompetente, care, la rîndul lor, sintetizează anticorpi. Anticorpii antispermatozoizi proprii determină o orchită autoimună care conduce la sterilitate.

2. Dacă unele celule formează proteine distincte pe care le sechestrează și le feresc de contactul cu aparatul anticorpo-formator. De aceea nu se stabilește toleranța naturală față de aceste componente; dacă însă vreodată în cursul vieții proteinele se eliberează din celule, ele pot induce sinteza de anticorpi. Este cazul proteinelor din cristalinul ochilor, al tireoglobulinei și al unor constituenți ai celulei nervoase cerebrale. Cu oricare dintre aceste trei componente se poate realiza autoimunizarea animalului, prezența autoanticorpilor în sînge trădîndu-se prin efecte patologice evidente. Astfel, autoanticorpii anti-cristalin provoacă inflamarea ochilor, precum și diferite boli intraoculare. Anticorpii anti-tireoglobulină provoacă o gușă tiroidiană limfoadenoidă, cunoscută și sub numele de *boala lui Hashimoto*. Eliberarea tireoglobulinei din foliculul tiroid în care se sintetizează poate să fie determinată de o alterare a membranei acestuia și să provoace astfel o reacție imunologică.

3. Dacă sistemul imunitar prezintă anomalii ca rezultat al unei mutații la nivelul celulelor imunocompetente. Astfel, poate să apară un mutant care să reacționeze cu antigene normale ale gazdei și să se declanșeze sinteza de anticorpi. Această posibilitate a fost sugerată de cercetarea cauzelor care provoacă anemia hemolitică dobîn-

Scanned with OKEN Scanner

dită. S-a observat că transferînd celule splenice de la o linie consanguină de șoareci care sufereau de o anemie hemolitică spontană la șoareci mai tineri sănătoși, din aceeași linie, aceștia făceau și ei o anemie hemolitică. Deoarece posibilitatea de a fi transmis o dată cu celulele și un agent infectant a fost exclusă, aceste cercetări sugerează că boala a fost transmisă prin celule splenice, imunologic anormale. Anomalia acestor limfocite splenice se manifestă prin aceea că ele sintetizează anticorpi care se pot combina cu determinanți antigenici de pe suprafața globulului roșu *normal*. Ca rezultat al acestei combinări, globulele roșii se distrug și apare anemia hemolitică.

4. Dacă substanțe macromoleculare prezente în mod normal în organism sînt alterate (prin virusuri, microorganisme patogene, radiații, medicamente sau chiar prin anticorpi) astfel ca pe suprafața lor să apară grupări chimice care să fie imunogene.

Astfel, unii autori consideră că anemia hemolitică, despre care am vorbit înainte, este determinată de apariția unui antigen *nou* pe globulul roșu ca rezultat al acțiunii unui virus sau a unei enzime bacteriene asupra membranei sale. În sprijinul acestei păreri sînt aduse cazurile de anemie hemolitică dobîndită în urma unei pneumonii atipice primare sau a unei mononucleoze infecțioase.

Unele medicamente, ca penicilina, chinidina sau altele, pot să se combine în organism cu o proteină *normală* și astfel să acționeze ca anti-

Scanned with OKEN Scanner

gene. Anticorpii formați sînt dirijați atît față de medicament cît și față de proteina normală „modificată"; ei pot fi cauza fenomenelor de idiosincrazie față de medicament. Este un caz de rupere a toleranței imunologice față de un component *propriu* în urma modificării de structură pe care o suferă acesta prin combinare cu medicamentul. De altfel, acest mecanism s-a demonstrat prin ruperea toleranței iepurilor față de propria lor tireoglobulină, în urma administrării unei tireoglobuline străine. De asemenea, iepurii făcuți toleranți față de albumina serică umană au început să fabrice anticorpi față de această proteină, dacă li s-a administrat albumină „ușor modificată", adică cuplată cu o haptenă.

În urma hiperimunizării prelungite a unui animal, în sîngele său circulă cantități mari de anticorpi, care se găsesc uneori combinați cu antigenul. Deoarece în urma acestei combinări anticorpul suferă anumite modificări ale configurației sale, care concură la apariția unor determinanți antigenici noi (în regiunea Fab), organismul sintetizează anticorpi față de aceștia. Apar astfel *anti-anticorpi*, un exemplu elocvent de anihilare a toleranței înnăscute față de imunoglobulina proprie.

Anticorpi dirijați împotriva anticorpilor, iată o situație neobișnuită care încheie satisfăcător demonstrația noastră. Ea arată încă o dată că anticorpii nu sînt decît un instrument prin care organismul încearcă să revină la situația inițială normală și că ei pot fi îndreptați împotriva lor înșiși. Cîtă distanță între acest punct de vedere și „credința naivă că procesele imune sînt pur și

Scanned with OKEN Scanner

simplu desemnate de Providență pentru protejarea organismului împotriva invaziei bacteriene", (Gell și Coombs) de la care a pornit cercetarea anticorpilor.

Imunoglobuline patologice

Există o boală curioasă care lovește, e drept rar, în special bărbații peste 40—50 de ani. Ea se manifestă destul de insidios. Bolnavii pierd din greutate, se plîng de oboseală și de dureri difuze în oase și au hemoragii frecvente ale gingiilor și nasului. Efectuînd electroforeza și imunoelectroforeza serului acestor bolnavi, se constată o creștere enormă a uneia dintre cele trei imunoglobuline (IgG, IgM sau IgA). Astfel, dacă în sînge există, în mod normal, cam 1—1,5 mg IgM/ml ser, în cursul bolii concentrația acestei imunoglobuline poate atinge valori de 40—60 mg/ml. Făcînd o puncție sternală bolnavilor, cu scopul de a afla proporția și starea celulelor care sintetizează imunoglobulinele, se constată înmulțirea excesivă a celulelor plasmatice mature și mai ales imature, tablou histologic ce amintește un cancer al celulelor limfoide. De aceea boala s-a numit *mielom* (cînd afectează sinteza IgG și IgA) și *macroglobulinemie Waldenström* (după numele descoperitorului ei) cînd afectează sinteza IgM (vezi capitolul 8). Creșterea în ser a concentrației uneia dintre aceste imunoglobuline se datorează faptului că celulele care le sintetizează suferă un proces de malignizare. Deoa-

Scanned with OKEN Scanner

rece celulele cancerizate invadează și sufocă treptat celulele limfoide normale (care sintetizează celelalte imunoglobuline), în mieloame se constată o scădere considerabilă (pînă la anulare) a imunoglobulinelor „normale" în favoarea imunoglobulinelor „patologice" sintetizate de celulele cancerizate.

Așa cum s-a spus și în capitolul 3, aproape jumătate din bolnavii de mielom elimină în urină o proteină specială, numită Bence-Jones, care nu este altceva decît lanțul ușor al imunoglobulinei patologice sintetizată în exces. Deoarece secreția în urină a proteinei B-J este semnificativă numai pentru mielom, detectarea acestei proteine are o mare valoare pentru stabilirea unui diagnostic precis. Pentru depistare se utilizează comportarea neobișnuită a acestei proteine față de creșterea temperaturii: precipită prin încălzirea urinei la 50—60°C, dar se dizolvă prin ridicarea temperaturii la 80—100°C! Să precizăm că toate proteinele precipită ireversibil prin această tranziție termică.

Mielomul se caracterizează prin apariția unor tumori multiple la nivelul oaselor (de aici și numele complet al bolii: *mielom multiplu*). Ele sînt responsabile pentru durerile difuze pe care le acuză bolnavii la nivelul oaselor. Diagnosticul obiectiv se face cu ajutorul razelor X, care pun în evidență arii perforate, fără regenerare, în coaste, coloana vertebrală, claviculă, craniu și în oasele umărului și ale bazinului.

Din cele expuse mai sus rezultă că un diagnostic sigur al mielomului multiplu sau al macroglobulinemiei Waldenström impune examinarea

Scanned with OKEN Scanner

imunoglobulinelor din sînge, a proteinei B-J în urină, a celulelor ce sintetizează imunoglobuline din măduva oaselor și a integrității oaselor.

Este bine cunoscut faptul că în urma unei infecții, cantitatea de anticorpi, mai ales de tip IgG, crește considerabil în sînge. Se pune întrebarea: cum poate fi diferențiată această creștere de cea care are loc în mielomul IgG?

Răspunsul îl dă teoria selecției clonale. Dacă cancerizarea începe prin alterarea funcției unei *singure* celule, în sensul că ea se divide exagerat de repede și de aceea nu ajunge niciodată la maturitate, înseamnă că în mielom toate plasmocitele imature care sintetizează cel mai bine imunoglobulinele (vezi capitolul 7) vor proveni dintr-o singură celulă cap de clonă. Cum o singură celulă are capacitatea de a sintetiza un singur fel de imunoglobulină (vezi capitolul 9), rezultă că celulele mielomatoase nu sînt decît o clonă dezvoltată anormal prin cancerizare. Clona produce deci o imunoglobulină unică, care nu prezintă fenomenul de variabilitate a secvenței aminoacizilor în capătul N-terminal al lanțului L și al fragmentului Fd (vezi capitolul 3). Acest lucru arată că imunoglobulina mielomatoasă este *omogenă*, fiind alcătuită din molecule identice. Dacă ținem seama de faptul că în serul normal există cam 50 000 de feluri de molecule de imunoglobuline, fiecare cu o structură primară ce are o „mică" particularitate în situsul de combinare (vezi capitolul 9), rezultă că mielomul restrînge enorm această diversitate, reducînd-o la o singură specie de molecule. Din acest motiv se consideră că mielomul nu înseamnă de fapt

Scanned with OKEN Scanner

sinteza unei proteine anormale, ci sinteza cu precădere a unui component *normal*, care însă se găsește în cantitate atît de mică în ser, încît nu-și poate manifesta proprietățile caracteristice. S-a dovedit că fiecare imunoglobulină mielomatoasă conține determinanți antigenici unici și că aceștia corespund la o proporție oarecare de molecule „normale" prezente în imunoglobulinele unui om sănătos. De aceea, eterogenitatea imunoglobulinelor normale este consecința faptului că ele reprezintă un „amestec" de numeroase tipuri de imunoglobuline mielomatoase (vezi capitolul 3).

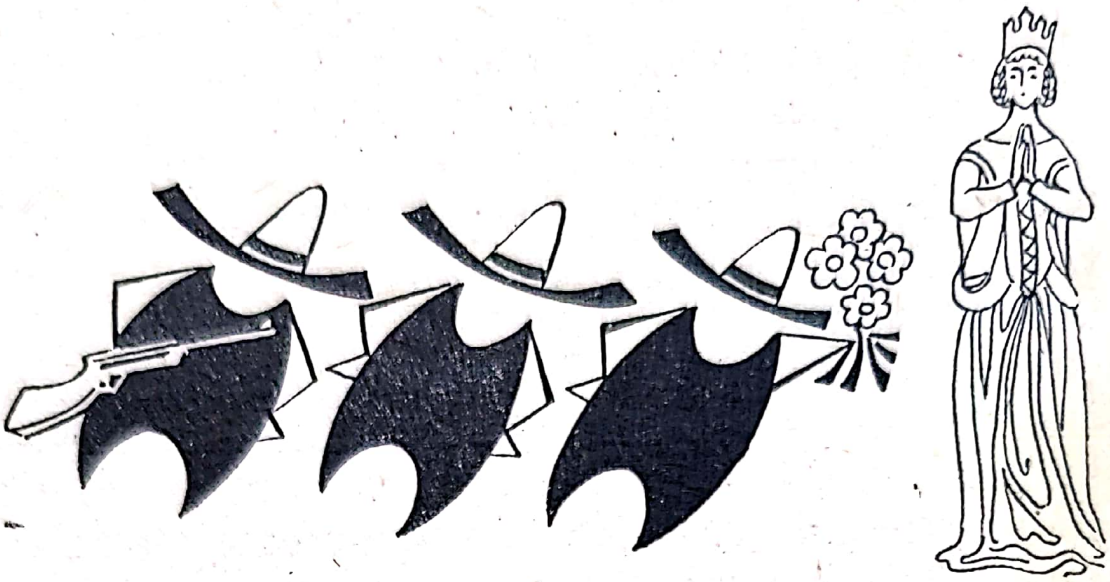
Întorcîndu-ne la întrebarea cu care am deschis această paranteză, să răspundem deci că, spre deosebire de imunoglobulinele care apar în infecții, cele mielomatoase vor prezenta *omogenitate*, însușire care poate fi detectată prin imunoelectroforeză (liniile de precipitare au forme caracteristice) sau prin analiza imunochimică sau electroforetică a lanțurilor L.

Rămînem cu o nedumerire: de ce nu prezintă și anticorpii fenomenul de omogenitate, din moment ce și ei sînt sintetizați numai de anumite clone?

În primul rînd, lipsa de omogenitate se datorează faptului că agentul infectant este compus dintr-un mozaic de antigene, fiecare avînd la rîndul său un număr variabil de grupări determinante. Deci în organism vor lua naștere tot atîtea feluri de anticorpi cîte grupări antigenice conține agentul patogen, cifră care poate fi de ordinul zecilor sau chiar sutelor.

În al doilea rînd, un singur determinant antigenic poate pune în mișcare mai multe clone,

Scanned with OKEN Scanner



Pentru organism anticorpii pot fi: dăunători, neutri și folositori

dacă acestea posedă receptori care corespund suficient de bine cu determinantul pentru a porni sinteza de anticorpi. De aceea, chiar și anticorpii anti-haptenă, deși mai omogeni decît imunoglobulinele normale, sînt considerabil mai eterogeni decît cele mielomatoase. Acest lucru arată că populația de anticorpi derivă într-adevăr dintr-un număr mai restrîns de clone, dar numai foarte rar dintr-o singură clonă. Ultima situație s-a observat în cazul imunizării iepurilor cu un antigen streptococic. Anticorpii specifici ating concentrații de 55 mg/ml ser, prezintă omogenitate și par a avea o origine monoclonală. Omogenitatea anticorpilor poate fi legată de structura particulară a antigenului folosit (polizaharid compus din repetarea unei unități glucidice neobișnuite). De fapt, animalele sintetizează și alți anticorpi, numai că aceștia se găsesc într-o cantitate nesemnificativă în raport cu cei secretați de clona principală.

Scanned with OKEN Scanner

Descifrarea secvenței aminoacizilor în situsul de combinare necesită anticorpi omogeni. Acest deziderat ar putea fi îndeplinit dacă s-ar putea detecta o activitate de anticorp în imunoglobulinele mielomatoase. Trierea capacității acestora de a reacționa cu un număr foarte mare de antigene apare ca o muncă de Sisif, datorită faptului că proteinele mielomatoase pot avea cele mai neașteptate specificități. Hazardul a ajutat această investigație și pînă în prezent s-au detectat cîteva mieloame în care imunoglobulinele au prezentat o activitate de anticorp față de o haptenă (dinitrobenzen) și streptolizina *O*. Aceste rezultate au deschis drumul spre descifrarea structurii situsului de combinare a anticorpilor.

Scanned with OKEN Scanner

13

În care se arată unde se încheie acțiunea anticorpilor și se trag cuvenitele învățăminte

„Dacă un cobai este inoculat cu o cultură pură de bacili tuberculoși, rana se închide de regulă în cîteva zile și pare că se vindecă. Totuși, după 10—14 zile apare un nodul tare, care se deschide repede într-un ulcer ce persistă pînă cînd animalul moare. Rezultatul este complet diferit dacă un cobai tuberculos este injectat cu bacili tuberculoși (...). La astfel de animale, de asemenea, rana rezultată în urma inoculării se închide la început, dar nu se formează nici un nodul. Totuși, după o zi sau două, la locul de injectare apare o schimbare ciudată. Locul se întărește și capătă o culoare închisă; aceste schimbări nu se limitează numai la punctul de inoculare, ci se întind pe o suprafață cu un diametru de 0,5—1 cm. În zilele următoare devine evident că pielea alterată este necrotică. În cele din urmă

Scanned with OKEN Scanner

ea cade, lăsînd un ulcer superficial ce se vindecă de obicei rapid și pentru totdeauna. Acest efect este produs nu numai de bacilii tuberculoși vii, dar și de bacilii omorîți prin expunerea lor prelungită la temperaturi scăzute, prin fierbere sau prin unele chimicale".

Robert Koch, căruia îi aparține, de altfel, minuțioasa descriere prezentată mai sus, a putut arăta că o astfel de activitate poate fi produsă și de un extract din bacilii tuberculoși, numit de el *tuberculină*. Această experiență i-a dat multe speranțe deșarte lui Koch în dorința sa de a găsi un vaccin împotriva tuberculozei. Dacă tuberculina lui Koch n-a putut lecui tuberculoza, în schimb ea a constituit un test, pus la punct de imunologul francez Mantoux, pentru diagnosticarea tuberculozei. Este vorba de binecunoscuta *intradermoreacție* (*IDR*) sau *reacția la tuberculină*, care se utilizează pe scară largă mai ales la depistarea copiilor ce au intrat în contact cu bacilii tuberculoși. După administrarea tuberculinei, la persoanele neinfectate nu se observă nimic, în timp ce la un bolnav de tuberculoză se constată că după cîteva ore pielea se înroșește în jurul punctului de inoculare pe o suprafață avînd un diametru de 1—2 cm. Înroșirea devine maximă după 48 de ore și persistă, scăzînd în intensitate pînă la o săptămînă. Această comportare ne amintește de fenomenele de hipersensibilitate cutanată, pe care le-am descris la capitolul 11, în paragraful consacrat alergiei. Spre deosebire de alergie, fenomenul descris mai sus nu se manifestă intens imediat, ci cu o întîrziere de cîteva zile, de aceea el a primit și numele de

Scanned with OKEN Scanner

hipersensibilitate întîrziată. Acest fel de alergie nu apare însă numai la tuberculină, ci poate fi provocat de foarte multe substanțe chimice care se întrebuințează în industrie, cum ar fi sărurile de nichel și crom, acidul picric și derivații săi, sau parafenilendiamina, un colorant utilizat pentru vopsirea părului. După un prim contact cutanat cu aceste substanțe, organismul devine *sensibilizat* și la repetarea contactului el declanșează o reacție de hipersensibilitate întîrziată tipică. Mai mult decît atît, orice fel de proteină poate da naștere unui fenomen de hipersensibilitate întîrziată, cu condiția ca ea să fie administrată intradermic sau subcutanat (deci local) în amestec cu adjuvant Freund complet (conținînd și corpi microbieni).

Deosebirea esențială dintre hipersensibilitatea de tip imediat și cea întîrziată nu rezidă în faptul că ultima apare mai tîrziu, ci în aceea că ea nu pare a fi mediată de anticorpi. Într-adevăr, toate încercările de a transfera pasiv hipersensibilitatea întîrziată de la un animal sensibilizat la altul normal, prin administrarea unor cantități cît de mari de ser sanguin, n-au fost încununate de succes, în timp ce acest transfer se realizează cu ușurință în cazul hipersensibilității imediate. Transferul hipersensibilității întîrziate poate fi realizat numai prin celule obținute din ganglionii limfatici, splină sau din sîngele periferic al indivizilor sensibilizați. Aceste celule sînt de fapt limfocite sensibilizate și ele sînt capabile să transmită hipersensibilitatea atît timp cît trăiesc și funcționează în organismul în care au fost transferate. Acest fapt a făcut ca hipersensibilitatea întîrziată să

Scanned with OKEN Scanner

fie considerată un fenomen general de imunitate determinat de activitatea specifică a limfocitelor. De aceea, fenomenul a fost rebotezat cu numele general de *imunitate celulară specifică* sau *imunitate mediată prin celule (cell mediated immunity)*. S-ar părea că aici se termină însă acțiunea anticorpilor, deoarece ei par a nu juca nici un rol în acest fenomen imunitar. Pentru a exclude însă participarea anticorpilor din aceste fenomene trebuie să se dovedească că limfocitele nu posedă pe suprafața lor nici un fel de receptori asemănători cu anticorpii și că specificitatea fenomenului de hipersensibilitate întîrziată se bazează pe un alt sistem chimic de recunoaștere. Or, acest lucru nu numai că nu s-a putut demonstra, dar există suficiente date care sugerează că limfocitele implicate în hipersensibilitatea întîrziată conțin receptori asemănători cu anticorpii. De aceea, chiar dacă anticorpii circulanți nu au nici un rol în imunitatea celulară, în schimb anticorpii legați de celule sînt cei ce asigură *specificitatea* fenomenului.

Specificitatea imunității celulare

Lucrările lui Landsteiner asupra haptenelor (capitolul 5) au arătat că prin injectarea unei haptene legate de o proteină se obțin anticorpi capabili să reacționeze cu haptena fixată de orice fel de proteină. Rezultă că anticorpii formați au o specificitate strictă pentru haptenă.

În experiențe de acest fel aplicate în hipersensibilitatea întîrziată, începute tot de Land-

Scanned with OKEN Scanner

steiner, s-au obținut rezultate oarecum diferite. S-a constatat că cobaii sensibilizați cu complexe haptenă-proteină sînt capabili să reacționeze numai dacă li se administrează haptena legată de aceeași proteină și nu de alta. Pare deci că hipersensibilitatea întîrziată față de haptenă este adaptată nu numai față de ea, dar și față de o porțiune învecinată a proteinei suport.

Trebuie notat aici că, pentru a provoca o hipersensibilitate întîrziată, toate substanțele chimice citate mai sus trebuie să se combine în prealabil cu proteinele din piele. Combinarea agentului sensibilizant cu proteinele proprii organismului apare deci ca o condiție preliminară *necesară* pentru acțiunea lor ulterioară atît în reacția de sensibilizare cît și în cea de declanșare. Tot aici se cuvine să subliniem că pentru a provoca o reacție de hipersensibilitate întîrziată, complexul haptenă-proteină trebuie administrat *local*, de preferat în amestec cu adjuvant Freund complet; injectat intravenos, el determină apariția anticorpilor circulanți și dispariția fenomenului de hipersensibilitate întîrziată.

Evenimente celulare implicate în hipersensibilitatea întîrziată

Aplicînd pe pielea unui animal o substanță sensibilizatoare (de exemplu oxazolonă sau dinitroclorbenzen), se produc evenimente celulare semnificative în ganglionul limfatic care drenează locul de aplicare. Se constată că în regiunea

Scanned with OKEN Scanner

paracorticală a ganglionului (limfatic) apar numeroase celule cu talie mare *(imunoblaști)*, care nu posedă reticul endoplasmatic și nu sintetizează anticorpi. Imunoblaștii nu pot proveni decît din transformarea limfocitelor mici, care se găsesc în mod normal în această zonă. La rîndul lor, imunoblaștii, cam la 6 zile de la aplicarea substanței sensibilizante, se divid și dau naștere la limfocite mici, care sînt capabile să reacționeze cu substanța sensibilizantă dacă aceasta se aplică din nou pe piele, provocînd o reacție cutanată tipică. De aceea, aceste limfocite se numesc *limfocite efectoare*. Reacția lor cu substanța sensibilizantă este posibilă deoarece o parte dintre ele părăsesc ganglionul și circulă în sistemul limfatic, inclusiv la nivelul la care se repetă aplicarea agentului.

În cursul transformării limfocit → imunoblast → limfocit efector, în acesta din urmă apare un număr semnificativ mai mare de lizozomi. Îmbogățirea limfocitelor efectoare cu lizozomi explică capacitatea acestora de a vătăma celulele învecinate prin descărcarea enzimelor hidrolitice lizozomale la locul reacției cutanate, în urma reacției cu antigenul. Se creează astfel condițiile chimice care determină tabloul histologic tipic pentru reacția cutanată. Trebuie subliniat că în urma combinării limfocitelor efectoare cu antigenul ele eliberează o proteina care a fost numită *factor de inhibare a migrării macrofagelor*. Așa cum arată și numele, proteina imobilizează macrofagele și astfel ele nu mai pot părăsi zona în care s-a petrecut reacția. Injectînd această

Scanned with OKEN Scanner

proteină într-un animal normal, se constată în zona inoculării fenomene cutanate cu același aspect morfologic și histologic ca în cazul hipersensibilității întîrziate.

Anticorpi-receptori

Care este factorul chimic care se găsește pe suprafața limfocitelor și determină interacțiunea specifică cu antigenul?

La început s-a crezut că este vorba pur și simplu de anticorpi circulanți de un tip special, care au proprietatea de a se fixa pe limfocite. Ei au fost identificați în ser și au primit denumirea de *anticorpi citofili* (iubitori de celule). Experiențe ulterioare au arătat că anticorpii citofili nu intervin în fenomenele de hipersensibilitate întîrziată. Ei participă numai în fenomenele de hipersensibilitate imediată, cum este — de exemplu — anafilaxia (vezi capitolul 11 și figura 23).

Anticorpii nu se fixează pe suprafața limfocitelor venind din altă parte, ci sînt elemente structurale ce constituie membrana limfocitelor. Ei sînt sintetizați de către limfocitele efectoare, sînt așezați pe membrana celulară și pot reacționa cu antigenul în afara celulei, la suprafața ei. Deoarece există o diferență netă între specificitatea anticorpilor circulanți și cea a receptorilor de pe limfocit (vezi paragraful despre specificitate), s-a presupus că cele două lanțuri polipeptidice sînt complexate cu alte componente ale membranei

Scanned with OKEN Scanner

și de aceea nu sînt asamblate întocmai ca în molecula anticorpilor circulanți. O astfel de structură posibilă ar putea fi asemănătoare cu modelul prezentat în figura 7 b, în care anticorpul are doar un singur situs de combinare. Specificitatea diferită a receptorilor din membrană ar putea fi determinată în acest caz de neparticiparea sau participarea mai scăzută a lanțurilor L la constituirea situsului de combinare. De aceea lanțul H poate asigura o unire stabilă cu antigenul numai dacă este implicată o zonă mai largă din molecula acestuia. Așa s-ar putea explica de ce reacțiile de hipersensibilitate întîrziată cer ca în gruparea determinantă a unui complex haptenă-proteină să fie implicată pe lîngă haptenă și o parte din zona adiacentă a moleculei proteice de suport.

Faptul că există celule care conțin în membrana lor receptori-anticorpi, pe care nu-i cedează tot timpul vieții lor, și celule care fabrică anticorpi pe care îi secretă în mediul înconjurător, se explică prin evoluția pe care au suferit-o anticorpii în cursul dezvoltării filogenetice a vertebratelor. Probabil că la început anticorpii au fost doar componente ale membranei celulare care au prezentat variații de structură de la celulă la celulă, ceea ce a permis acestora să intervină specific în procesele de apărare. O dată cu evoluția țesutului limfoid, acești receptori au putut fi sintetizați în forme încă mai variabile și într-o formă chimică care le-a permis să se desprindă de pe membrană și să pătrundă în mediul înconjurător, exercitînd o acțiune de apărare independentă de celulele care i-au sintetizat.

Scanned with OKEN Scanner

La vertebratele actuale există ambele forme de apărare, atît cea mai veche care implică celule cu anticorpi atașați de suprafața lor, cît și celule care au capacitatea de a elibera anticorpi în mediul înconjurător.

Mecanismele imunității celulare

Inocularea locală a antigenului provoacă fixarea lui în țesuturi. În această zonă sosesc, ca după introducerea oricărui corp străin, leucocitele polimorfonucleare. Ele își descarcă aici conținutul celular, ceea ce produce o modificare a permeabilității zonei din jurul injecției. În consecință, încep să se perinde la acest nivel limfocitele mobile care provin din zona timus-dependentă a organelor limfoide. Dintre acestea, cele care posedă receptori specifici pentru antigenul depozitat în țesut interacționează cu acesta și părăsesc apoi zona într-o stare „stimulată". Această stare poate însemna că limfocitul a fixat pe suprafața sa antigenul (sau un fragment din el) sau că interacțiunea a indus o modificare metabolică preparatoare pentru o viitoare diviziune. Limfocitul „stimulat" părăsește zona pe calea vaselor limfatice locale și se oprește în cel mai apropiat ganglion limfatic așezat pe traseul său de întoarcere. Datorită modificărilor pe care le-a suferit în urma interacțiunii cu antigenul, limfocitele stimulate se stabilesc în regiunea paracorticală a ganglionului. Deci limfocitul stimulat își pierde mobilitatea o dată ajuns în ganglion.

Scanned with OKEN Scanner

După 2 zile de aparentă liniște, limfocitele stimulate încep să crească în volum și se transformă în imunoblaști care cîteva zile mai tîrziu încep să se dividă dînd naștere limfocitelor mici „efectoare". Aceste limfocite efectoare păstrează pe suprafața lor receptorii limfocitelor stimulate, de aceea ele sînt considerate a avea „memorie". Ele au o viață lungă, ceea ce explică de ce starea de hipersensibilitate întîrziată a unui organism se menține luni și uneori ani de zile.

După aproximativ două săptămîni de la sensibilizare, organismul este apt să prezinte o reacție de hipersensibilitate întîrziată, dacă i se aplică tratamentul declanșator. Repetarea inoculării poate să se facă în apropierea locului în care s-a făcut prima injecție, sau în oricare altă parte a corpului, rezultatul fiind același.

La locul de introducere a antigenului reinoculat se prezintă la scurt timp (cîteva ore) limfocitele efectoare. Ele intră în conflict cu antigenul grație receptorilor specifici. Drept rezultat, din limfocitele efectoare se eliberează substanțe farmacologic active, printre care amintim factorul de inhibiție a migrării macrofagelor și un factor care produce o creștere a permeabilității vasculare și o trecere a limfocitelor și a macrofagelor în țesuturi. Aceste substanțe sînt responsabile pentru efectele inflamatorii tipice hipersensibilității întîrziate. Astfel, macrofagele care migrează din vase în țesut nu mai pot lua calea întoarsă, fiind imobilizate aici de către factorul de inhibare a migrării lor. În consecință, aceste celule descarcă la fața locului tot echipamentul

Scanned with OKEN Scanner

lor enzimatic deosebit de bogat în hidrolaze, ceea ce produce răspunsul inflamator cu edem și infiltrație leucocitară, atît de tipic hipersensibilității întîrziate.

Transplantarea și supravegherea imunologică

În capitolul 12 ne-am străduit să dovedim că respingerea unei grefe este produsă de anticorpi și — într-o oarecare măsură — de celulele imunocompetente. Anticorpii au fost consideraţi pînă nu de mult ca suficienți pentru a da seama de reacțiile care se petrec în timpul rejecțiilor. Această concepție este astăzi practic abandonată, deoarece s-au adus fapte experimentale de necontestat că rejecția grefelor este un fenomen de imunitate celulară în care anticorpii liberi joacă cel mult un rol secundar. Implicarea imunității celulare în transplantare se bazează pe următoarele dovezi:

1. Aspectul histologic al rejecției de grefă este identic cu cel al hipersensibilității întîrziate.
2. Celulele sensibilizate pot ataca și distruge *celulele-țintă* ale grefei incompatibile fără participarea anticorpilor liberi și a complementului.
3. Suprimarea anticorpilor anti-transplant nu modifică durata de supraviețuire a acestuia.
4. Anticorpii nu pot distruge un transplant o dată prins.
5. Anticorpii anti-limfocit inhibă rejecția grefei incompatibile prin imobilizarea limfocitelor efectoare.

Scanned with OKEN Scanner

Ar fi de remarcat, în plus, că transplantarea unui țesut străin înseamnă de fapt introducerea în organismul gazdei a antigenelor de histocompatibilitate. Cum ele nu pot circula în organismul gazdei, limfocitele acesteia sînt cele care vizitează transplantul, astfel că se creează de fapt condiții absolut similare cu cele care declanșează hipersensibilitatea întîrziată (antigen blocat la poarta de intrare).

Rejecția grefelor incompatibile poate fi considerată ca un aspect particular al unui fenomen de *supraveghere imunologică* pe care îl exercită celulele imunocompetente în organism. Aceste celule „caută și distrug" orice celulă *aberantă* care poartă pe suprafața ei un determinant antigenic cu care ele nu sînt „obișnuite". Aberația celulelor este un fenomen care are loc continuu într-un organism pluricelular atît de complex ca cel al vertebratelor. Antigenele aberante apar în celule fie din cauze „interne", cum ar fi mutația sau îmbătrînirea lor, fie din cauze „externe" legate de acțiunea virusurilor și altor microorganisme. Celulele aberante sînt recunoscute, distruse și eliminate de celulele imunocompetente care patrulează în organism și a căror agresivitate este integral dovedită. Supravegherea imunologică pe care o fac celulele imunocompetente este eficientă și în cazul tumorilor canceroase. Cîte tumorete alcătuite din celule cu determinanți antigenici aberanți nu sînt distruse încă în faza incipientă, fără ca individul să bănuiască ce dramă cu sfîrșit fericit se consumă în organismul său. Apariția tumorilor este de fapt consecința înșelării celulelor supraveghetoare. Ea se petrece în cazurile

Scanned with OKEN Scanner

în care celulele canceroase nu prezintă o structură antigenică mult diferită de cele sănătoase și au capacitate mare de proliferare. Cînd prezența lor alarmează sistemul celular de supraveghere este prea tîrziu, deoarece tumora a atins deja dimensiuni prea mari.

În loc de concluzii

Care este factorul care decide ca un organism să producă un răspuns imun prin celule sau prin anticorpi? Rezultatele par să arate că diferența esențială constă în aceea că în imunitatea celulară, celulele imunocompetente se deplasează spre locul unde antigenul este depozitat, pe cînd în reacția imună cu anticorpi, antigenul este cel ce ajunge la celulele imunocompetente. Ar părea deci că hipersensibilitatea poate fi provocată prin *imobilizarea* antigenului, pe cînd fabricarea anticorpilor impune pătrunderea antigenului la locul unde domiciliază celulele imunocompetente. Din acest motiv, atunci cînd se inoculează repetat un animal cu un antigen în adjuvant Freund, instalarea unei stări de hipersensibilitate tranzitorie precede și uneori însoțește sinteza de anticorpi. O parte din antigen este imobilizat la locul de intrare și el va da naștere la imunitate celulară, pe cînd cealaltă parte care intră în circulație va stimula sinteza anticorpilor.

Un antigen care încearcă să pătrundă în organism utilizînd porțile pe care agenții patogeni le folosesc de obicei (tegumente, mucoase, calea digestivă și cea respiratorie), este „atacat“ ime-

Scanned with OKEN Scanner

diat de celulele polimorfonucleare și macrofage care tind să-l înglobeze și să-l distrugă. Această reacție este, desigur, celulară, dar *nespecifică*. Dacă acest atac nu este eficient sau lasă în urma sa elemente constitutive încă străine pentru organism, atunci intervin limfocitele cu receptori anticorpi care se angrenează într-o reacție de apărare specifică. În principiu, dacă această reacție este suficient de puternică pentru a opri chiar la poarta de intrare antigenul, atunci organismul nu mai este obligat să pună în funcțiune ultima sa linie de apărare — anticorpii.

Antigenul scăpat în mediul intern se concentrează în organele limfoide care, reamintim, sînt alcătuite dintr-o regiune paracorticală (cu limfocite timus-dependente) și una corticală (cu limfocite ce provin din măduva oaselor) (vezi capitolul 7). Limfocitele timus-dependente sînt mobile, au receptori pe suprafața lor și sînt capabile de recunoaștere imunologică; cele dependente de măduva oaselor sînt fixe și sînt apte să se transforme în plasmocite.

Antigenele pătrunse în ganglionul limfatic interacționează cu limfocitele timus-dependente, care le apar primele în cale, printr-un mecanism similar cu cel descris la hipersensibilitatea întîrziată, cu deosebire că procesul nu are loc în piele. În ganglionul limfatic, la această interacțiune se asociază ulterior și limfocitele dependente de măduva oaselor, care se diferențiază și se divid transformîndu-se în celule ce sintetizează anticorpi. Este clar că acest ultim proces de cooperare deosebește sinteza de anticorpi de imunitatea celulară. În absența cooperării organismul poate

Scanned with OKEN Scanner

reacționa numai printr-un mecanism strict celular, așa cum de altfel am văzut că se petrece în cazul în care limfocitele timus-dependente sînt silite să ia contact cu antigenul imobilizat la distanță de ganglionul limfatic.

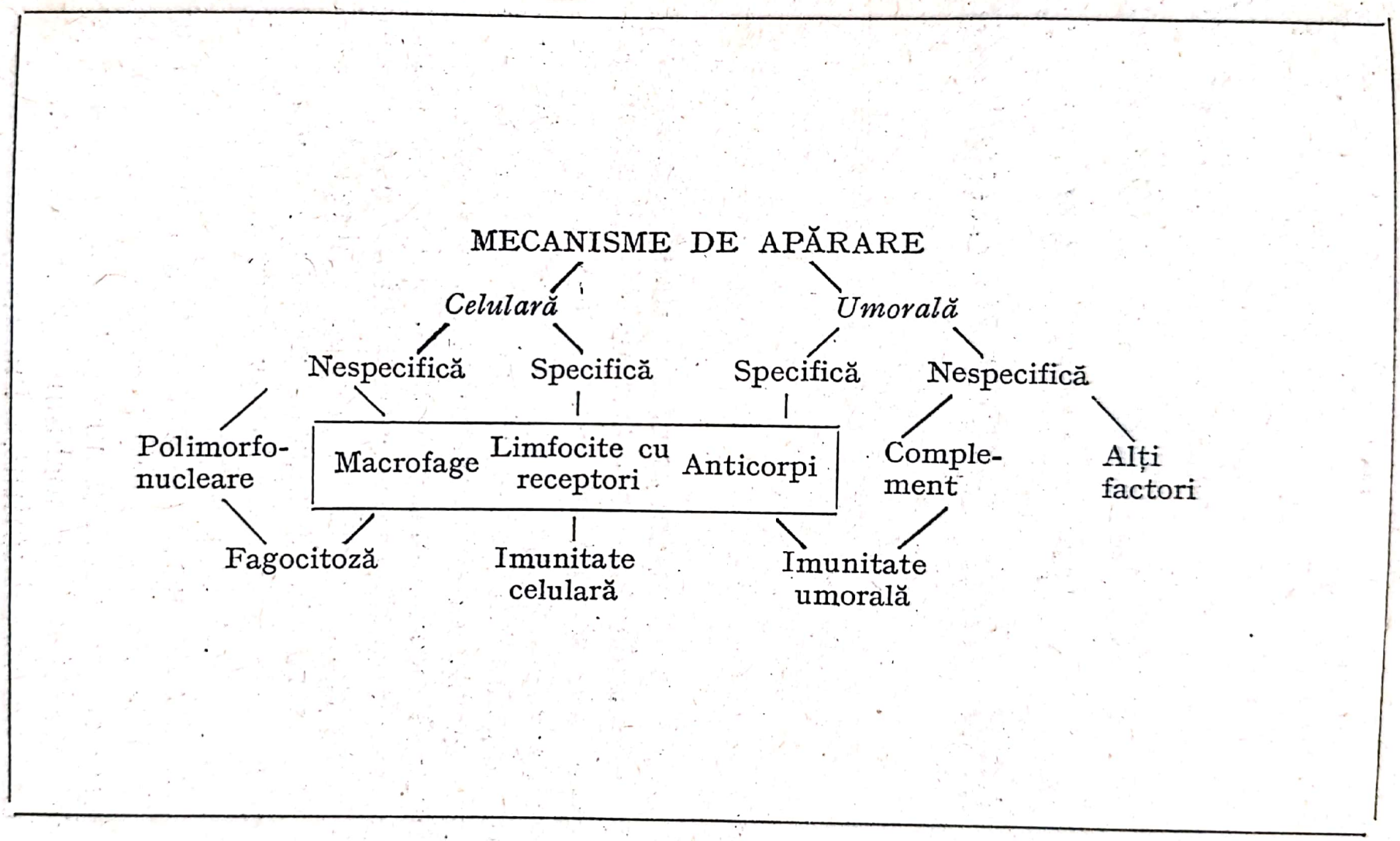
Mecanismele de apărare la vertebrate pot fi grupate astfel ca asocierea macrofag-limfocite cu receptor-anticorpi să fie evidentă. (Vezi pag. 215.) Din nefericire pentru experimentator, aceste mecanisme se întrepătrund atît de strîns, încît numai excepțional au putut fi disociate și analizate independent unele de altele.

Desigur că mecanismele celulare nespecifice sînt prezente deja la nevertebrate (ca și cele umorale nespecifice), după cum cele celulare specifice sînt prezente la unii pești primitivi, care nu au însă capacitatea de a sintetiza anticorpi.

Introducînd un antigen în organismul unui vertebrat asistăm la o cascadă de evenimente celulare care implică urcarea tuturor treptelor filogenetice cam în următoarea ordine:
1. antigen→fagocit (imunitate celulară nespecifică) ;2. antigen → fagocit + limfocit cu receptori (imunitate celulară specifică) ;
3. antigen → fagocit + limfocit cu receptori + limfocit anticorpo-sintetizator (imunitate umorală specifică).

Rezultă că fabricarea anticorpilor este un act de maximă specializare pe care vertebratele îl săvîrșesc sprijinindu-se pe toate mecanismele de imunitate pe care ancestorii lor le-au posedat. Anticorpii apar astfel ca o chintesență a mecanismelor de apărare pe care evoluția a distilat-o cu grijă în laboratoarele naturii.

Scanned with OKEN Scanner


MECANISME DE APĂRARE
Celulară
Umorală
Nespecifică
Specifică
Specifică
Nespecifică
Polimorfo-nucleare
Macrofage
Limfocite cu receptori
Anticorpi
Comple-ment
Alți factori
Fagocitoză
Imunitate celulară
Imunitate umorală

14

În care cititorul este invitat să cunoască mai multe despre anticorpi, însă fără ajutorul autorului

Abia cînd m-am așezat la masă și am privit hîrtia imaculată pe care trebuia să-mi aștern gîndurile am socotit că n-ar strica să-mi găsesc, pentru zilele negre, cîteva ajutoare de nădejde. Am îngrămădit astfel pe masa de lucru cărți spre care nu rareori am întins mîna și care m-au ajutat să exprim mai clar unele idei sau să expun mai exact unele experiențe. Cititorii care doresc să parcurgă drumul înapoi, să ajungă la sursă și să soarbă direct „nectarul delicios" vor găsi mai la vale lista cărților pe care le-am răsfoit în clipele fără inspirație.

Dacă conținutul acestei cărți a fost menținut în limitele general admise pentru un material de informare științifică și nu s-a transformat într-un „Fals tratat de imunochimie", cum am fost adesea tentat să-mi intitulez lucrarea, acest fapt se

Scanned with OKEN Scanner

datorează în bună măsură redactorului acestei cărți, Gheorghe Pal, de la Editura enciclopedică, căruia îi adresez vii mulțumiri și pe această cale. De asemenea sînt recunoscător colegilor din sectorul de imunochimie al Institutului de biochimie care m-au ajutat să elimin acele părți care nu erau clar expuse în manuscris.

Cartea se încheie cu un glosar care cuprinde o listă alfabetică a termenilor ce apar în lucrare și nu sînt explicați pe loc în text. Definițiile au fost scoase mai ales din Dicționarul medical, Editura medicală, București, 1969.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie

M. Balș, *Boli infecțioase, vol. I*, Ed. medicală, București, 1968.

J. Bordet, *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*, Masson, Paris, 1939.

N. Cajal, R. Iftimovici, *Din istoria luptei cu microbii și virusurile*, Ed. științifică, București, 1964.

V. Gheție, V. Micușan, *Analiza imunochimică*, Ed. Academiei, București, 1966.

V. Gheție, *Fără proteine nu există viață*, Ed. științifică, București, 1968.

D. F. Gray, *Imunologie*, Ed. medicală, București, 1966.

F. Haurowitz, *Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies*, Intersci, New York, 1968.

J. A. Humphrey, A. G. White, *Immunology for students in medicine*, Blackwel, Oxford, 1970.

E. A. Kabat, *Structural concepts in immunology and immunochemistry*, Holt, Rinehart a. Winston Inc. New York, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

Glosar

Aglutinare — Reacție antigen-anticorp în care antigenul este reprezentat prin hematii, bacterii etc. și care se caracterizează prin formarea unor conglomerate de hematii sau bacterii vizibile cu ochiul liber și la microscop. Anticorpii care produc aglutinarea se numesc aglutinine.

Blast — Denumire dată celulelor de origine, imature, nediferențiate, constituind elementul de bază de la care pornesc diferitele serii celulare.

Catepsină — Enzimă celulară care degradează proteinele. Se cunosc 5 tipuri de catepsine (A—E). Sinonime: protează celulară, enzimă proteolitică celulară.

Cromatografie — Metodă fizico-chimică de separare a componentelor dintr-un amestec care are ca principiu trecerea componentelor aflate în soluție peste un suport solid introdus într-o coloană de sticlă.

Dacă suportul are proprietatea de a schimba ionii săi cu componentele dizolvate în amestecul analizat determinînd legarea acestora, metoda se numește *cromatografie de schimb ionic*. Dezlegarea succesivă a componentelor de pe suport (numit schimbător de ioni) se face prin creșterea concentrației sărurilor din soluția cu care se spală

Scanned with OKEN Scanner

coloana sau prin modificarea pH-ului ei. Cromatografia pe schimbători de ioni permite separarea proteinelor după sarcina lor electrică, similar cu electroforeza.

Difuziune — Fenomen de pătrundere a moleculelor unei substanţe în masa unei alte substanţe datorită mişcărilor de agitaţie termică moleculară.

Duct toracic limfatic — Vas colector principal prin care circulă limfa şi care trece prin cavitatea toracică.

Electroforeză — Fenomen de migrare către polul pozitiv (anod) sau polul negativ (catod) a particulelor încărcate electric şi conţinute într-o soluţie tampon prin care trece un curent electric. După mediul în care are loc migrarea, se disting: e. în coloană de lichid (metoda Tiselius), e. pe hîrtie de filtru, e. în gel (agar, amidon, poliacrilamidă). Electroforeza este folosită pentru separarea şi analiza proteinelor şi a altor substanţe din amestecuri complexe (ser sanguin, urină, extracte tisulare etc.).

Enzimă — Catalizator proteic specific materiei vii care asigură desfăşurarea proceselor de sinteză şi degradare a substanţelor în organism.

Fagocit — Celulă dotată cu proprietatea de a ingera bacterii sau alte particule străine. Actul de ingerare este numit fagocitoză.

Fluorescenţă — Proprietate pe care o au unele substanţe de a emite o lumină colorată (albastră, roşie) atunci cînd sînt iradiate cu o lumină ultravioletă. Substanţele fluorescente care pot fi ataşate chimic de anticorpi se numesc fluorocromi. Anticorpii marcaţi cu fluorocromi se numesc anticorpi fluorescenţi. Ei pot fi detectaţi în celule la concentraţii foarte mici (a mia parte dintr-un miligram).

Ganglion limfatic — Masă de ţesut limfatic în forma unui bob de fasole intercalat în lungul vaselor limfatice. G. l. este alcătuit dintr-un sîmbure numit medulară şi o zonă periferică numită cortex, în care se formează limfocitele şi plasmocitele. Între medulară şi cortex există o zonă intermediară numită paracorticală, care conţine limfocite provenite din timus. De aceea zona se numeşte şi arie timus-dependentă. Sinonim: nodul limfatic.

Grupări nepolare — Grupări care nu pot forma legături de hidrogen (de exemplu — CH). Se mai numesc şi grupări hidrofobe (nu pot stabili legături cu moleculele de apă). Leu şi Ileu sînt aminoacizi tipici cu grupări nepolare.

Scanned with OKEN Scanner

Forţele care atrag grupările nepolare una de cealaltă se numesc şi forţe *Van der Waals*.

Grupări polare — Grupările care pot forma legături de hidrogen (de exemplu — NH, —OH). Se mai numesc şi grupări hidrofile (iubitoare de apă). Asp şi Glu sînt aminoacizi cu grupări polare.

Hemoliza — Fenomenul de distrugere a globulelor roşii (hematii, eritrocite), cu eliberarea hemoglobinei. Hemoliza poate fi provocată de anticorpi anti-hematie, în prezenţa complementului. Anticorpii anti-hematie se mai numesc şi hemolizine.

Izotopi radioactivi — Elemente chimice care au acelaşi număr de ordine în tabloul lui Mendeleev, dar diferă între ele prin greutatea atomică şi au proprietatea de a emana radiaţii.

Legături de hidrogen — Legături care se stabilesc între hidrogenul unui grup oxidril sau aminic şi oxigenul sau azotul unei alte grupări chimice învecinate. Formarea l.h. este rezultatul îndepărtării unui electron de pe atomul de hidrogen, care devine electropozitiv şi este atras de către regiunea încărcată negativ a unui atom de oxigen sau de azot dintr-o grupare învecinată.

Mutant — Organism sau celulă care manifestă caractere schimbate faţă de parentalii săi.

Mutaţie — Eveniment care constă din schimbări ale mesajului genetic ce pot rămîne apoi stabile în succesiunea generaţiilor.

Soluţie tampon — Soluţie cu pH-ul determinat pe care şi-l păstrează la adăugarea de acizi sau baze.

Streptolizină — Hemolizină produsă de streptococi. Induce formarea anti-streptolizinei în organismul bolnavilor cu afecţiuni streptococice (de exemplu scarlatină).

Ultracentrifugare — Operaţie de sedimentare a particulelor coloidale sau a macromoleculelor, cu ajutorul unei centrifuge care realizează viteze mari de rotaţie (pînă la un milion de ori mai mult decît forţa gravitaţiei). Proteinele sînt sedimentate în straturi cu atît mai apropiate de fundul eprubetei de centrifugă cu cît greutatea lor moleculară este mai mare. Din datele furnizate de un sistem optic care înregistrează sedimentarea, se calculează greutatea moleculară a proteinelor analizate.

Scanned with OKEN Scanner

Viața anticorpilor — Timpul cît o populație de anticorpi persistă în organism de la fabricarea sau inocularea ei pînă la distrugerea ei. Se exprimă în timp de înjumătățire (T/2) care reprezintă timpul în care se distruge jumătate din cantitatea de anticorpi introdusă (sau fabricată) în organism T/2 pentru imunoglobulinele umane (în zile): IgG (23), IgA (6), IgM (5) și IgD (3).

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

1

Pag.

În care se pune o întrebare și se răspunde printr-un scurt istoric al descoperirii și cunoașterii anticorpilor 5
Pasteur și Mecinikov 5
Behring și Landsteiner 9
Era modernă 13

2

În care se face o digresiune despre proteine și acizii nucleici cu scopul de a netezi drumul spre cunoașterea anticorpilor 16
Aminoacizii 16
Lanțurile polipeptidice 18
Fabrica de proteine și acizii nucleici 23

3

În care cititorul este introdus într-un laborator de imunochimie și este îndemnat să privească mai îndeaproape anticorpii 31

Scanned with OKEN Scanner

Chirurgia chimică a anticorpului 35
Arhitectura anticorpilor 40
Structura primară a imunoglobulinelor 43

4

În care se prezintă lista anticorpilor înscriși să candideze la apărarea organismului și se face o scurtă caracterizare a activității lor 50

5

În care se prezintă tot felul de antigene și se discută despre însușirea lor de a da naștere anticorpilor 59
Haptene și grupări determinante 62
Constelația antigenică 66
Specificitatea antigenică 71

6

În care se enumeră condițiile care se cer unei substanțe pentru a fi antigen 75
Străin și propriu 75
Dimensiuni și compoziție chimică 77
Degradarea antigenelor 80
Răspunsul organismului 81
Antigenicitate cu imunogenicitate? 82
Adjuvanții 83

7

În care se urmărește soarta antigenului introdus în organism și se fac referiri speciale la felul în care acesta acționează asupra celulelor producătoare de anticorpi 86
Întîi a fost metoda! 87
Interacțiunea antigenului cu macrofagul 89
Superantigenele 93
Competența imunologică la nivel celular 95
Timusul și originea celulelor imunocompetente 101
O controversă: rolul complexelor antigen-ARN 103

8

În care se descrie felul în care se sintetizează anticorpii în celule, dar se uită să se explice cum își lasă antigenul ampreta în molecula anticorpilor 105

Scanned with OKEN Scanner

Asamblarea moleculei 106
Cîte molecule de anticorpi pot fi sintetizate într-o celulă? 109
Împiedicarea fabricării anticorpilor 110
Succesiunea IgM-IgG 111
Răspunsul primar 112
Răspunsul secundar şi celulele cu memorie..... 115
Paralizia imunologică 118

9

În care se completează ceea ce s-a uitat să se spună în capitolul precedent şi se prezintă teoriile asupra formării anticorpilor 120
Teoria selecţiei clonale 122
Toleranţa şi autorecunoaşterea 128
Teoria matriţei 134

10

În care se prezintă unirea anticorpului cu antigenul şi cum este folosită ea în laboratoare 141
Reacţia de precipitare 146
Imunodifuzia 153
Anticorpi fluorescenţi 157
Reacţia de aglutinare şi complementul 160
Aplicaţiile hemolizei 163

11

În care se dovedeşte că anticorpul nu este un instrument predestinat pentru îndeplinirea unui anumit scop..... 167
Vaccinarea şi seroterapia 172
Anafilaxia şi alergia 176

12

În care se vorbeşte despre rolul anticorpilor în transplantări, cancer şi boli autoimune 181
Anticorpii ajută creşterea tumorilor?..... 187
Autoagresiunea 190
Imunoglobuline patologice 194

Scanned with OKEN Scanner

13

În care se arată unde se încheie acțiunea anticorpilor și se trag cuvenitele învățăminte 200
Specificitatea imunității celulare 203
Evenimente celulare implicate în hipersensibilitatea întîrziată 204
Anticorpi-receptori 206
Mecanismele imunității celulare 208
Transplantarea și supravegherea imunologică 210
În loc de concluzii 212

14

În care cititorul este invitat să cunoască mai multe despre anticorpi, însă fără ajutorul autorului 216
Bibliografie 219
Glosar 221

Scanned with OKEN Scanner

În curînd în librării:

Soran, Viorel
DE LA MOLECULĂ LA VIAȚĂ
Colecția „ORIZONTURI"

Bazată pe cele mai noi cuceriri ale biologiei moleculare, biochimiei și biofizicii, lucrarea are meritul că reușește să lămurească probleme importante referitoare la originea și evoluția vieții, integrarea organismului în mediu, procesele energetice și metabolice și altele.

Prin ce se deosebește viul de neviu? Din ce sînt alcătuite ființele vii? Ce se înțelege prin ultrastructura și funcția moleculelor biologice? Este pregătită biologia modernă pentru descifrarea în viitorul apropiat a esenței vieții? Există viață în universul exatraterestru? Iată întrebări la care cititorii găsesc răspunsuri în această lucrare.

Scanned with OKEN Scanner

În curînd în librării:

Bittman, Emil

ARMELE SECRETE ALE ORGANISMULUI

Colecția „ORIZONTURI"

Această lucrare este menită să lămurească unor largi cercuri de cititori cîteva probleme față de care nimeni nu rămîne indiferent. Este organismul viu capabil să se apere de efectele nocive ale unor factori de mediu? Care sînt „armele secrete" și cum funcționează mecanismele prin care organismul învinge foamea, setea, variațiile concentrației de oxigen, variațiile de temperatură, pierderile de sînge, infecțiile, intoxicațiile ș.a.? Iată cîteva dintre problemele cărora autorul le dă un răspuns în lucrare, reușind să evidențieze universalitatea fenomenului de integrare a organismului în mediu prin intermediul mecanismelor de reglare și echilibrare a funcțiilor vitale.

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: GHEORGHE PAL
Tehnoredactor: CONSTANȚA BRANCIU

Coli de tipar: 7,25

Tiparul executat sub comanda
nr. 1478
la Întreprinderea poligrafică
„13 Decembrie 1918",
str. Grigore Alexandrescu nr. 89—97,
București,
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner

Lei 5

în aceeași colecție:

Gr. Moisil, *Îndoieli și certitudini*

Cartea este alcătuită dintr-o serie de „tablete" în care autorul, savant de mare prestigiu, intervine cu pasionată combativitate în probleme din cele mai actuale ale vieții matematice românești și mondiale, ale corelației dintre știință și aplicațiile ei. Lectura lucrării, scrisă în forma deosebit de sugestivă, plină de vervă, caracteristică autorului, prilejuiește cititorului o adevărată desfătare.

Holban Ion, *Realizarea personalității, hazard sau știință?*

Probleme esențiale pentru viață, legate de orientarea școlară și profesională și de aportul științei în realizarea personalității umane... Peste 30 de ani de activitate în diferite laboratoare de psihologie aplicată i-au permis autorului să-și contureze convingerea că, alături de asistența medicală, omul are nevoie și de o asistență psihologică, pedagogică, sociologică.

P. V. Makoveţki, V. N. Lange,
Paradoxuri și sofime fizice

Lucrarea cuprinde un șir de probleme de fizică, în aparență destul de simple, dar... paradoxale. Mulți s-au grăbit să le dea soluții imediate și categorice dar greșite: „bunul simț" i-a împins în capcană. Rezolvînd asemenea probleme înveți să aplici corect legile fizicii la fenomene concrete, să analizezi mai profund lucrurile, să vezi esența și nu aparențele.

Scanned with OKEN Scanner